

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen

Über die Wirkung einiger Hämolysine
auf die Membranen von Erythrozytenstromata

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Heinrich Schmitt
aus Oldenburg i.O.

Giessen 1974



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen

Über die Wirkung einiger Hämolsine auf die Membranen von Erythrozytenstromata

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Heinrich Schmitt
aus Oldenburg i.O.

Giessen 1974

Aus dem Institut für Anatomie und Histologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Über die Wirkung einiger Hämolytika
auf die Membranen von Erythrocyten

Dekan: Prof. Dr. med. D. Ringleb
Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Wellensiek
Korreferent: Prof. Dr. med. E. Habermann

Das Institut für Anatomie und Histologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Heinrich Schmidt
am Obitenium 19.

Gießen 1974

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	2
II. <u>Literaturübersicht</u>	5
a) Komplement	5
b) Saponin	7
c) Streptolysin 0	10
d) Staphylolysin	12
III. <u>Material und Methoden</u>	15
IV. <u>Ergebnisse</u>	19
A) Bestimmung optimaler Versuchsbedingungen für die Einschleusung von radioaktiven Markermolekülen	19
a) Einschleusung von Trasylol	19
b) Einschleusung von Albumin	25
c) Einschleusung von Ferritin	28
B) Die Freisetzung radioaktiver Markermoleküle aus Erythrozytenstromata unter der Einwirkung ver- schiedener hämolytischer Agenzien	31
a) Die Wirkung von Hypotonie auf Stromata	31
b) Die Wirkung von Komplement, Saponin, Strepto- lysin 0 und Staphylolysin auf Erythrozyten- stromata	33
1) Die Freisetzung von Trasylol-J ¹²⁵	33
2) Die Freisetzung von Albumin-J ¹²⁵	37
3) Die Freisetzung von Ferritin-J ¹²⁵	39
4) Die Freisetzung von Trasylol, Albumin und Ferritin unter der Einwirkung von Komple- ment (Versuch 16)	39
V. <u>Diskussion</u>	43
VI. <u>Zusammenfassung</u>	51
VII. <u>Literaturverzeichnis</u>	53

I. Einleitung und Fragestellung

Unter Hämolyse versteht man den Austritt von Hämoglobin durch die Erythrozytenmembran in das umgebende Medium.

Die Einwirkung von Hämolsinen an der Erythrozytenmembran kann sehr unterschiedliche Folgen haben. Einige Hämolsine wie z. B. Phospholipase C in genügend hoher Konzentration oder das Bienengift-Peptid Melittin führen zu groben, schon lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturveränderungen (HABERMANN und MÖLBERT, 1954; HABERMANN und POHLMANN, 1959). Hämoglobin kann sofort durch die großen Membrandefekte in das umgebende Medium entweichen.

Andere Hämolsine wie z. B. Resorzin oder Salizylsäure haben eine diskretere Wirkung. Sie schädigen die lichtmikroskopisch scheinbar intakte Erythrozytenmembran in der Weise, daß diese ihre selektive Undurchlässigkeit für Kationen verliert. Intrazelluläres Kalium verläßt den Erythrozyten, extrazelluläres Natrium dringt dafür ein. Wegen der hohen intrazellulären Hämoglobinkonzentration und des damit verbundenen kolloidosmotischen Druckes dringt Wasser zum Ausgleich in die Zelle ein, der Erythrozyt schwillt und verliert dann sein Hämoglobin durch die überdehnte Zellmembran. Diese Art der Hämolyse wird als kolloidosmotische Hämolyse bezeichnet (WILLBRANDT, 1940).

Eine kolloidosmotische Hämolyse kann prinzipiell durch alle Hämolsine hervorgerufen werden, die Läsionen von so geringer Größe in der Erythrozytenmembran hervorrufen, daß Hämoglobin nicht unmittelbar entweichen kann. Die Läsionen müssen andererseits so groß sein, daß ein freier Austausch von Kationen und Wasser über die Membran möglich wird.

Über die Größe von Läsionen bei einer kolloidosmotischen Hämolyse lassen sich bisher nur Aussagen machen anhand des Molekulargewichtes und der Molekülgröße von Stoffen, die eine Hämolyse verhindern, wenn man sie dem extrazellulären Medium zufügt. So können

durch Resorzin, Salizylsäure, Röntgen- oder UV-Bestrahlung geschädigte Erythrozyten durch Saccharose im äußeren Medium vor der Lyse geschützt werden, da Saccharose nicht in die Erythrozyten penetriert und damit den kolloidosmotischen Druck des Hämoglobins ausgleicht. Auch die Immunnäolyse durch Antikörper und Komplement wird als Sonderform der kolloidosmotischen Hämolyse angesehen, da sie zwar nicht durch Saccharose, wohl aber durch hohe Albuminkonzentrationen verhindert werden kann (GREEN und GOLDBERG, 1960).

Wenn auch vieles dafür spricht, daß bei der Immunnäolyse Löcher in der Erythrozytenmembran entstehen, so sind doch Zweifel an dieser Vorstellung berechtigt, da sich mit der Gefrierätztechnik keine Löcher in den Membranen nachweisen lassen (WELLENSEK, 1970; SEEMANN und ILES, 1973) und die bei der Negativkontrastdarstellung im Elektronenmikroskop sichtbaren 80 Å im Durchmesser messenden Fleckchen auch als Folge von Proteinauflagerungen auf der Membran gedeutet werden können.

Jeder Zweifel an der Entstehung von Löchern unter der Einwirkung von Antikörpern und Komplement könnte beseitigt werden, wenn es gelänge, radioaktiv markierte Substanzen von definiertem Molekulargewicht in Erythrozyten einzuschließen und zu zeigen, daß bestimmte dieser Substanzen nach der Komplementeinwirkung die Erythrozyten wieder verlassen.

Auf dieser Überlegung, die von Prof. HABERMANN, Pharmakologisches Institut der Universität Gießen, an uns herangetragen wurde, basieren die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche.

Das Prinzip der Versuchsanordnung bestand darin, mit Jod-125 markierte Moleküle definierter Größe in Erythrozyten während hypotoner Lyse einzuschleusen. Nach Isotonisierung des umgebenden Mediums und Stabilisierung der Membranen wurden die gewaschenen Erythrozytenschatten der Einwirkung verschiedener hämolytischer Reagenzien ausgesetzt.

Da die Hämolysine auf nahezu hämoglobinfreie Stromata einwirken, liegt der Vorzug der Versuchsanordnung in der Ausschaltung des kolloidosmotischen Anteils am Lysemechanismus. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrozytenschatten wurde die Radioaktivität im Sediment und im Überstand getrennt bestimmt.

Die Wirkung von Komplement, Saponin, Streptolysin O und Staphylolysin wurde untersucht. Nach Ausarbeitung optimaler Versuchsbedingungen für die Beladung von Hammelerythrozytenschatten mit radioaktiven Markersubstanzen sollte festgestellt werden, ob sich überhaupt die Entstehung von Löchern in der Membran der Stromata unter der Einwirkung der Hämolysine nachweisen läßt. Außerdem sollten erste Daten über die etwaige Größe dieser hämolysininduzierten Löcher gewonnen werden. Der folgende Abschnitt faßt in Form einer Literaturübersicht zusammen, was bisher über die Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Hämolysine bekannt ist.

II. Literaturübersicht

a) Komplement

Das Komplementsystem umfaßt eine Gruppe von 11 verschiedenen Serumproteinen, die zu den β -Globulinen gehören und die durch Antigen-Antikörper-Komplexe in einer komplizierten Reaktionssequenz aktiviert werden können (59). Erfolgt die Aktivierung des Komplementsystems durch alle Reaktionsstufen einschließlich Beteiligung der 9. Komplementkomponente (C 9) und geschieht dies an oder in der unmittelbaren Nähe von Zelloberflächen, so tritt eine irreversible Schädigung der betroffenen Zellmembran auf. Die Folgen sind Cyto-lyse und Zelltod. Die Zerstörung von Erythrozyten durch Antikörper und Komplement wird als Immuhämolyse bezeichnet.

GREEN, BARROW und GOLDBERG beschrieben 1959, daß Kaninchen-Antikörper und Komplement die Permeabilität von Mäusekrebs-Ascites-Tumorzellen und Erythrozyten verändern. Wenn Antikörper und Komplement in einem Medium mit geringer Proteinkonzentration auf Ascites-Tumorzellen einwirkten, kam es zu einem raschen Verlust von intrazellulärem Kalium nach außen. Gleichzeitig verloren die Zellen Aminosäuren und Ribonukleotide und wurden vollkommen permeabel für Natrium aus dem Medium. Die Zellen schwollen sehr stark an und verloren fast alle Makromoleküle an das Medium. Hämoglobin entwich aus Erythrozyten, Protein und Ribonukleinsäure aus Ascites-Tumorzellen. Wenn Antikörper und Komplement in einem Milieu einwirkten, dessen Proteingehalt so hoch war, daß der kolloidosmotische Druck der Zellen ausgeglichen wurde, dann konnte das Schwellen der Zellen verhindert werden. So konnte die Immuhämolyse mit 3×10^{-3} M Albumin oder entsprechenden Mengen hochpolymeren Polyvinylpyrrolidons (PVP) verhindert werden, nicht aber mit Saccharose. Makromoleküle traten in Gegenwart von Albumin und PVP nicht aus den Zellen aus, aber der Kaliumverlust und der Natriumeintritt waren unverändert vorhanden und der Verlust von Amino-

säuren und Ribonukleotiden war nur wenig verändert.

GREEN und Mitarbeiter zogen hieraus den Schluß, daß Antikörper und Komplement funktionelle "Löcher" in der tierischen Zellmembran erzeugen. Die Löcher gestatteten eine Equilibrierung von Kationen und kleinen Molekülen zwischen Zelle und Medium. Dies wiederum würde zu einem Anwachsen des osmotischen Druckes in der Zelle und zu einem raschen Influx von Wasser führen. Die "Löcher" in der Zellmembran würden dabei gedehnt und machten erst so den Austritt von Makromolekülen aus der Zelle möglich.

Die Autoren diskutierten auch die Frage, ob es sich bei den "Löchern" um Vergrößerungen von Poren handeln könne, deren Vorhandensein schon normalerweise in der Erythrozytenmembran angenommen wird (23, 42, 49, 51) und deren Radius von SALOMON 1960 (56) mit 3,5 bis 4,2 Å, je nach Spezies errechnet wurde.

SEARS und Mitarbeiter wiesen 1964 nach, daß Dextran 40 ebenso wie Albumin in hoher Konzentration den Hb-Austritt vollkommen verhindert, während Dextran 20 dies nur unvollkommen vermochte (53).

1963 beschrieben HUMPHREY und DOURMASHKIN erstmals elektronenmikroskopisch Veränderungen an Erythrozytenmembranen unter der Einwirkung von Antikörpern und Komplement (38). Nach der Negativkontrastdarstellung mit Phosphorwolframsäure beobachteten sie an Erythrozytenmembranen runde, manchmal asymmetrische, elektronendichte Flecken, die von einem helleren Saum umgeben waren. Sie deuteten diese Flecken als Läsionen. Der Durchmesser der zentralen Anteile der Läsionen lag nach Behandlung mit Meerschweinchenkomplement zwischen 85 und 95 Å, nach Einwirkung von Human- komplement zwischen 100 und 110 Å, mit einem mittleren Durchmesser von 88 - 103 Å (39, 40).

BORSOS, DOURMASHKIN und HUMPHREY bestätigten 1964 die von Manfred MAYER begründete Ein-Treffer-Theorie der Immunnäolyse anhand der Übereinstimmung der Zahl der elektronenoptisch nach-

weisbaren Läsionen mit der Zahl der errechneten Komplementtreffer (14). 1965 bestimmten HUMPHREY und DOURMASHKIN die Anzahl der notwendigen 19 S Antikörper, die zur Entstehung wenigstens einer Membranläsion auf der Erythrozytenoberfläche anhaften müssen; sie fanden, daß wahrscheinlich ein 19 S Antikörpermolekül ausreicht, um in Gegenwart von Komplement eine Membranläsion hervorzurufen, während etwa 1000 7 S Antikörpermoleküle für den gleichen Effekt notwendig sind. Formalin und Trypsinbehandlung beeinflussten die Ausbildung der Läsionen unter der Einwirkung von Komplement nicht entscheidend, so daß Veränderungen in der Lipidschicht der Membran angenommen wurden (38). Entsprechende Läsionen wie sie an Erythrozyten beobachtet worden waren, beschrieben BLADEN, EVANS und MERGENHAGEN 1966 in der Zellwand von *Escherichia coli* (12). BLADEN, GEWURZ und MERGENHAGEN fanden gleichartige Veränderungen in der Zellwand von *Veillonella alcalescens* bei Verwendung von Meerschweinchenkomplement (13). 1971 zeigten MEDHURST, GLYNN und DOURMASHKIN an *E. coli*-Zellen, die mit Mäusekomplement behandelt wurden, ebenfalls entsprechende Läsionen. Bei Verwendung von inaktiviertem oder komplementfreiem Serum fanden sich solche Membranveränderungen nicht (48).

b) Saponin

Zur Gruppe der Pflanzensterine gehören die Saponine oder Digitaloide. Sie haben die Eigenschaft, in Wasser stark schäumende, seifenartige Lösungen zu bilden.

Die Eigenschaft der Pflanzensaponine, rote Blutkörperchen auch in starker Verdünnung zu lysieren, ist seit langem bekannt. Entscheidend für die Haemolyse-Wirkung der Saponine ist, daß es sich um stark oberflächenaktive Substanzen handelt, die mit Cholesterin reagieren. RANSOM beobachtete 1901, daß die Zugabe von Cholesterin zu einer Saponinlösung die hämolytische Aktivität des Saponin aufhebt

(cit. nach 21). WINDAUS beschrieb 1909 erstmals, daß Cholesterin durch Digitonin präzipitiert werden kann und daß dabei ein Cholesterin-Digitonin-Komplex entsteht (cit. nach 21). PONDER berichtete 1948 von der Fähigkeit des Saponin, Cholesterinfilme zu durchdringen, eine Fähigkeit, die mit der hämolytischen Aktivität des Saponin parallel verlief (51).

Über elektronenmikroskopische Untersuchungen an Erythrozytenmembranen, Kükenleberzellen, sowie Rous-Sarkom-Virus-Präparationen, die Saponin und Digitonin-Lösungen unterschiedlicher Konzentration ausgesetzt wurden, berichteten DOURMASHKIN, DOUGHERTY und HARRYS 1962 (18). Die Viruspräparationen wurden durch stark verdünnte Saponin-Lösung inaktiviert. Erythrozytenmembranen waren bei Saponinkonzentrationen unter 0,03 % nicht sichtbar verändert, bei Konzentrationen von 0,05 % wurde eine, mit steigender Konzentration zunehmende Anzahl von Flecken in der Zellmembran sichtbar. Diese wiesen elektronenmikroskopisch häufig eine hexagonale Anordnung auf, der Durchmesser betrug im Durchschnitt $85 \text{ \AA}$, der Abstand von Flecken zu Flecken $140 - 160 \text{ \AA}$. Umgeben waren diese "Löcher" häufig mit einem ebenfalls hexagonal angeordneten Ring von etwa $30 \text{ \AA}$ Breite. Bei einer Saponinkonzentration von 0,09 % und darüber kam es zu einer vollständigen Zerstörung der Erythrozytenschatten, wobei massenhaft Fäden und Ringformen auftraten.

Daß Saponin Zellmembranen unterschiedlichster Herkunft in dieser Weise verändert, deuteten die Autoren als einen Anhalt für das Vorliegen einer generellen Struktur in den Membranen. Eine Bestätigung des regelmäßigen, zweidimensionalen, hexagonalen Maschenwerks wurde von HUSSON und LUZZATI 1963 aufgrund von Röntgenbeugungsuntersuchungen an menschlichen Erythrozytenmembranen erbracht (41). Auch sie beobachteten hexagonale Strukturen nur an saponinbehandelten Erythrozytenschatten mit einem Abstand von etwa $165 \text{ \AA}$. Im Gegensatz zu DOURMASHKIN und Mitarbeitern (18) sahen GLAUERT, DINGLE und LUCY (25) in der hexagonalen Anordnung nicht die

Darstellung präexistenter Lipid- und Proteinanordnungen der Zellmembran, sondern die molekulare Anordnung des entstandenen Cholesterol-Saponin-Komplexes; auch sie betrachteten aber die Ausbildung von "Löchern" im Lipidanteil der Zellmembran als das mögliche haemolytische Wirkungsprinzip des Saponins.

Es kann aufgrund der bisherigen Beobachtungen als sicher gelten, daß Saponin in entsprechender Konzentration regelmäßig 80 Å im Durchmesser messende Flecken bzw. "Löcher" in der Erythrozytenmembran erzeugt. Dieser elektronenmikroskopisch sichtbare Effekt kann durch vorherige Behandlung der Erythrozyten mit sublytischen Dosen von Digitonin aufgehoben werden. Optimale Mengen von Digitonin verhindern, daß die für Saponin typischen, elektronenmikroskopisch sichtbaren Läsionen auftreten (DOURMASHKIN und Mitarbeiter 1962). Es scheint daher, daß Saponin in der Membran mit dem Substrat (Cholesterin?) reagiert, an das sich auch Digitonin anlagert.

Nach Digitonineinwirkung auf menschliche Erythrozyten sieht man lichtmikroskopisch (HABERMANN und MÖLBERT, 1954) eine Vergrößerung der Membranstruktur; bei höheren Konzentrationen von Digitonin eine Bildung von Körnchen und Schuppen. Wahrscheinlich entspricht diese lichtmikroskopische Textur den starren kristallinen Strukturen, die mit dem Elektronenmikroskop beobachtet wurden (DOURMASHKIN und ROSSE, 1966). Die Kristalle entsprechen vermutlich Digitonin-Cholesterin-Komplexen, die sich in der Membran gebildet haben.

BANGHAM und HORNE (4) untersuchten elektronenmikroskopisch die Saponinwirkung auf künstliche Lipidmembranen, die aus Lecithin bzw. Cholesterin oder aus beiden Substanzen bestanden. Auch sie sahen ein aus Flecken bzw. "Löchern" bestehendes Gitterwerk mit einem Abstand der Flecken von 140 Å und einem Durchmesser der Flecken von ca. 80 Å. Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen eines hexagonalen Membranmusters nach Saponineinwirkung bei Negativ-Kontrastdarstellung wurden in der Folgezeit mehrfach bestätigt, so

auch von BORSOS, DOURMASHKIN und HUMPHREY (1964). DOURMASHKIN und ROSSE (1966) zogen den Schluß, daß die Reaktion zwischen Saponin und der Zellmembran nur die Lipide in der Membran betrifft und daß es sich bei diesen wahrscheinlich um Lecithin und Cholesterin handelt.

c) Streptolysin O

TODD unterschied 1938 auf immunologischem Wege zwei haemolytische Exotoxine bei haemolysierenden Streptokokken, die er als Streptolysin O bzw. Streptolysin S bezeichnete. Streptolysin O bekam diese Bezeichnung deshalb, weil es leicht durch atmosphärischen Sauerstoff reversibel inaktiviert wird. Das S in Streptolysin sollte auf die hohe Löslichkeit des Streptolysin S im Serum hinweisen. Wie andere O_2 -labile bakterielle Exotoxine behält Streptolysin O seinen Antigen-Charakter nach oxydativer Detoxifikation (17).

Während Streptolysin S nur von Streptokokken der Gruppe A, entsprechend der Einteilung nach LANCEFIELD, gebildet wird, entsteht Streptolysin O in β -haemolysierenden Streptokokken der Gruppe A, der Gruppe C und G und bewirkt aufgrund seiner Antigenität die Bildung entsprechender Antikörper.

Streptolysin O, das einen relativ großen Anteil an Schwefel, entweder in Disulfid- oder in Sulfhydrylform enthält, wird durch Substanzen, die Disulfid-Bindungen zu Sulfhydryl-Bindungen reduzieren, aktiviert. Durch proteolytische Enzyme wird Streptolysin O zerstört (5).

Zahlreiche Beobachtungen haben die in-vitro Toxizität (8, 20, 34, 62) von Streptolysin O auf Zellen unterschiedlicher Natur gezeigt, so Beobachtungen von BERNHEIMER und SCHWARTZ 1960, HIRSCH und Mitarbeitern 1963, ZUCKER-FRANKLIN 1965. Die polymorphkernigen Leukozyten von Mäusen und Kaninchen werden zerstört. FAUVE und Mitarbeiter untersuchten 1966 die Wirkung auf Mäuse-Makrophagen. Leukozyten erwiesen sich dabei als 100-fach resistenter gegen

Streptolysin 0 als Erythrozyten (33).

GINSBURG und GROSSOWICZ zeigten 1960 die zerstörende Wirkung von Streptolysin 0 auf Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in-vitro. BERNHEIMER beschrieb 1966 die Wirkung von Streptolysin 0 auf Mycoplasmen. Da das Protoplasma zahlreicher anderer Bakterienspezies hingegen nicht lysiert wurde, zog BERNHEIMER 1968 hieraus den Schluß, daß eine Korrelation zwischen Empfänglichkeit für Streptolysin 0 und der Anwesenheit von Cholesterin in der Zellmembran bestehen könnte. Das Lipid könnte einen Receptor für Streptolysin 0 darstellen, da Streptolysin 0 nur Zellen lysiert, deren Membran Cholesterin enthält.

Nach HALBERT (1970) könnte Streptolysin 0 durch das sulfhydrylhaltige Segment des Moleküls an das Cholesterin der Membran gebunden werden; andererseits wird seine Wirkung durch Antistreptolysin bzw. durch Zugaben von Cholesterin vollständig aufgehoben, was Anlaß zu der Frage gibt, in wie weit der Wirkungsmechanismus dem der Saponinlyse gleichen könnte. Die lysierende Wirkung des Streptolysins auf Erythrozyten verschiedener Tierspezies wurde u. a. von HOWARD und WALLACE (1953) untersucht. Dabei stellte sich eine recht unterschiedliche Empfindlichkeit heraus. So sind z. B. Mäuse-Erythrozyten etwa 40 mal resistenter gegenüber Streptolysin 0 als Hammel-Erythrozyten. Am empfindlichsten gegenüber der Wirkung von Streptolysin 0 zeigen sich Kaninchen-Erythrozyten.

Kinetische Untersuchungen des Lyse-Vorganges ergeben, daß bei niedriger Streptolysin 0 - Dosis eine relativ kurze Latenzperiode besteht, die mit steigender Dosis abnimmt, bis bei hoher Streptolysin 0 - Konzentration eine fast augenblickliche vollständige Haemolyse eintritt. Die Haemolyse läuft in zwei Schritten ab. In einer 1. Phase wird das reduzierte Streptolysin 0 an die Erythrozyten-Membran gebunden. Diese 1. Phase ist im Gegensatz zur 2., lytischen Phase, temperaturunabhängig.

Aufgrund mathematischer Überlegungen schlossen ALOUF und

RAYNAUD 1968, daß Streptolysin O durch die Zelle gebunden wird und dann keinen Einfluß mehr auf die Lysierung weiterer Erythrozyten ausüben kann (1,2). Sie schätzten die Zahl der Streptolysin O - Moleküle, die zur Absättigung der Fixationspunkte auf der Erythrozytenoberfläche notwendig sind, auf ca. 1.500 Moleküle und die Zahl der zu einer irreversiblen Lyse eines Erythrozyten notwendigen Moleküle auf etwa 150 - 360. Verglichen mit der notwendigen Zahl von Saponin-Molekülen von 2 Millionen bis zu mehreren Billionen und der Staphylokokken α -Toxin Molekülzahl von etwa 13.000 würde es sich bei Streptolysin O um ein sehr potentes lytisches Agens handeln.

Elektronenmikroskopische Darstellungen der durch Streptolysin O hervorgerufenen Membrandefekte an Erythrozyten wurden von DOURMASHKIN und ROSSE 1966 beschrieben. Streptolysin O soll in der Kaninchenerythrozyten-Membran ein im Durchmesser etwa 500 Å großes Loch, "the same type of hole as that made by phospholipase C", hervorrufen. 1969 beschrieben HUMPHREY und DOURMASHKIN Membranveränderungen an Schaf- und Kaninchenerythrozyten durch Streptolysin O als elektronenoptisch annähernd runde, durch Doppelringe umsäumte Defekte von etwa 400 Å Durchmesser.

d) Staphylokokken α -Toxin

Zu den verschiedenen, von Staphylokokken gebildeten exogenen Stoffwechselprodukten (Koagulase, Hyaluronidase, Enterotoxin, Leucocidin, Staphylokinase) gehören auch die Hämolsine. Staphylokokken α -Hämolsin kann aus Kulturfiltraten der meisten Staphylokokken-Stämme gewonnen werden; es stellt das wirksamste der toxischen Produkte pathogener Staphylokokken dar.

In den letzten Jahren gelang mehreren Arbeitsgruppen (3,9,16,44) die Herstellung hochgereinigten α -Toxins. Es handelt sich um ein Protein, dessen Aktivität durch Proteasen zerstört werden kann und dessen Kohlehydratgehalt wahrscheinlich weniger als 1 % beträgt. α -Toxin

enthält keine Disulfid- oder SH-Gruppen; es ist aber ein stark basisches Protein, dessen isoelektrischer Punkt pI bei 8,6 liegt und das neben Lysin und Arginin reichlich Glutamin und Asparagin enthält. Bis auf das Fehlen von Cystin weist die Aminosäurezusammensetzung im übrigen keine Besonderheiten auf. Als N-terminale Aminosäure ist Arginin festgestellt worden (7).

In der Ultra-Zentrifuge sedimentieren 85 - 90 % des Toxins mit einer Sedimentationskonstante von ca. 2,8 bis 3,1 S_{20}^w (3S), während 10 - 15 % des Toxins einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 12 S_{20}^w (12S) haben. Die 3 s-Fraktion ist die hämolytisch aktive Form des Toxins, die 12 s-Form ist nur wenig hämolytisch aktiv. Durch Behandlung mit Harnstoff kann aus der 12 s-Fraktion wieder hämolytisch aktives 3 s-Toxin gewonnen werden. Wahrscheinlich besteht die 12 s-Fraktion aus Aggregaten des Toxins. Das Molekulargewicht der 12 s-Komponente wird auf 240.000 bis 330.000 geschätzt (7). Es können sich schließlich bei der Präparation, auch durch Erhitzen auf 60°C, noch größere, unlösliche, aber antigene Toxin-Aggregate bilden. Die 3 s-Fraktion wäre demnach das aktive Toxin, während die 12 s-Fraktion und die unlöslichen Aggregate verschiedene Formen von Toxoiden wären.

Es bestehen Zweifel, ob die 3 s-Fraktion aus Molekülen einer einzigen Molekül-Species besteht (3, 7, 9, 16). Wahrscheinlich handelt es sich um ein inhomogenes Gemisch von Molekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 21.000 und 50.000.

Elektronenmikroskopisch sieht man bei der Untersuchung der 12 s-Fraktion 90 Å im Durchmesser messende Ringstrukturen, die aus 6, in hexagonaler Anordnung liegenden Untereinheiten aufgebaut sind und ein 20 - 25 Å im Durchmesser messendes Zentrum umschließen (22).

Ähnliche Ringstrukturen sieht man elektronenmikroskopisch auch nach der Einwirkung von α-Toxin an Erythrozyten-Membranen, anderen Zellmembranen und an den künstlichen Membranen von Lipo-

somen. An Erythrozyten, die nach der Toxineinwirkung noch nicht lysiert waren, ließen sich die Ringstrukturen nicht nachweisen, weshalb die Ringe zwar als charakteristische Folge der Toxineinwirkung, dennoch aber als Sekundäreffekt angesehen werden (3, 22).

Kinetische Untersuchungen des Hämolyse-Ablaufes (15, 46) unter der Einwirkung von α -Toxin führten zur Erkennung von 2 Hämolyse-Phasen. Eine prälytische Latenzperiode wird von einer Phase rascher Hämolyse unterschieden. In der prälytischen Phase beobachtet man den Verlust der selektiven Kationen-Permeabilität der Erythrozyten-Membran. Es kommt zu einem raschen Austritt von intrazellulärem Kalium nach außen (45). WEISSMANN et al., die 1966 die Wirkung von α -Toxin auf künstliche Liposomen untersuchten (58), bemerkten einen raschen Verlust an Kationen (Kalium und Natrium), Anionen (H_2PO_4^- , CrO_4^{--}) und anderen markierten Molekülen (Glukose).

Die α -Toxin-Hämolyse kann durch Saccharose und Polyäthylenglykol im äußeren Medium verhindert bzw. stark verzögert werden. Dieser Befund führte zu der Auffassung, daß es sich bei der α -Toxin-Hämolyse um eine Form der kolloidosmotischen Hämolyse handeln müsse. Unter α -Toxin-Einwirkung kommt es zu einem Verlust der selektiven Permeabilität der Erythrocyten-Membran, die Erythrozyten schwellen, die Membran wird überdehnt und die Zellen verlieren dann sehr rasch ihr Hämoglobin an das umgebende Medium. Vermutlich greift das Staphylokokken α -Toxin in der Lipidfraktion der Membran an (7). An Liposomen wurde festgestellt, daß die membranzerstörende Wirkung unabhängig vom Gehalt der Membranen an Cholesterin ist. Dieser Befund legt den Gedanken nahe, daß das Toxin mit den Phospholipiden der Membran reagiert. Bei der Interaktion von Toxinen mit Erythrozyten verschwindet das Toxin aus dem Überstand, es wird von den Erythrozyten-Membranen adsorbiert. Die elektronenmikroskopisch sichtbaren Ringstrukturen an Erythrozyten-Membranen werden als Molekülkomplexe des Toxins mit Membran-Phospholipiden aufgefaßt, die aber erst als Sekundär-Phänomen im Verlauf der Hämolyse entstehen sollen (3).

III. Material und Methoden

1) Puffer: In allen Versuchen wurde der von MAYER (47) angegebene isotone, mit 0,15 mM Ca^{++} und 0,5 mM Mg^{++} angereicherte Veronal-Puffer verwendet; Humanalbumin wurde in einer Endkonzentration von 0,5% zugesetzt. Zur Auflösung des Streptolysin O Reagenz, bzw. des Staphylolysin Reagenz, wurde isotone phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, entsprechend den Angaben des Herstellers (Behring-Werke AG) verwendet.

2) Erythrocyten: Hammelblut wurde unter sterilen Bedingungen in gleichen Teilen einer nach ALSEVER hergestellten Glucose - Citratlösung aufgefangen und das Blut vor Gebrauch eine Woche lang in dieser Lösung aufbewahrt. Die sedimentierten Erythrozyten wurden mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in einer Konzentration von etwa 5 % in Veronal-Puffer aufgenommen. Die genaue Standardisierung der 5 %igen Suspension erfolgte mit 0,1 %iger Natriumkarbonatlösung photometrisch bei 541 mμ nach der Vorschrift von MAYER (47). Eine O.D. von 0,7 entspricht danach einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen.

3) Amboceptor (Hämolyisin): Es wurde Amboceptor (Anti-Hammelerythrocyten Antikörper vom Kaninchen) mit einem Titer von 4.000 Einheiten der Behring-Werke AG, Marburg, benutzt. Unter einer Amboceptor-Einheit wird diejenige Menge Hämolyisin verstanden, die bei halbstündigem Aufenthalt im Wasserbad bei 37°C und einem Überschuß an Komplement 1×10^9 Zellen gerade noch vollständig lysiert.

4) Komplement: Meerschweinchenblut wird in silikonisierten Zentrifugengläsern aufgefangen. Das Blut gerinnt bei Zimmertemperatur während 1 - 2 Stunden, wird über Nacht im Kühlschrank stehengelassen und anderentags zentrifugiert. Das Serum mehrerer Tiere wird vereinigt und in 1 ml Portionen in der Tiefkühltruhe bei minus 70°C gelagert. Die Verdünnung des Vollkomplements erfolgte stets mit Veronal-Puffer.

5) Herstellung von sensibilisierten Hammelerythrozyten (EA):

Der Amboceptor wurde in einer Konzentration, die der 4 bis 6-fachen optimalen Sensibilisierungsdosis entsprach, in Veronal-Puffer aufgenommen und einem gleichen Volumen der 10^9 Zellen/ml enthaltenden Erythrozytensuspension langsam und unter Schwenken zugesetzt. Dieses Gemisch inkubierte 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad; anschließend wurden die Zellen 2 x in Veronal-Puffer gewaschen und durch Zentrifugieren ankonzentriert, so daß eine 10 %ige bzw. 50 %ige EA-Suspension entstand. Alle Hämolyse-Versuche wurden mit sensibilisierten Hammelerythrozyten (EA) durchgeführt.

6) Lytische Agenzien: An lysierenden Agenzien wurden benutzt:

- a) Meerschweinchen-Vollkomplement (s. unter 4)
- b) Saponin-weiss, rein (Firma Merck AG/Darmstadt, Artikel-Nr. 7695)
- c) Streptolysin 0, 2000 Einheiten Streptolysin 0 pro Fläschchen (Behring-Werke AG/Marburg)
- d) Staphylokokken α - Toxin, 5 Einheiten Staphylolysin pro Fläschchen (Behring-Werke AG/Marburg).

7) Bestimmung der 50% - Hämolyse - Einheiten (EH_{50}) der lytischen

Agenzien: Um in den späteren Versuchen vergleichbare Aktivitäten der lysierenden Agenzien auf die Erythrozytenschatten einwirken lassen zu können, wurde zunächst diejenige Menge des betreffenden lytischen Agens bestimmt, die genau 50% der im Versuch vorliegenden Erythrozyten auflöst. Diese Konzentration ermittelten wir in Anlehnung an die Methodik von MAYER (47) anhand der sigmaförmigen Dosis-Wirkungskurven mit Hilfe der VON KROGH' schen Gleichung $X = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$. Hierbei bedeutet X die Konzentration des lytischen Agens, y den Lysegrad, K eine Konstante und $1/n$ einen Faktor, der die Steilheit der Lysekurve widerspiegelt. Nach logarithmischer Transformation ergibt die VON KROGH' sche Gleichung bei graphischer Auftragung eine Gerade. Wird $\frac{y}{1-y}$ auf der Abszisse gegen $\log X$ auf der Ordinate (X = Konzentration des lytischen Agens) auf-

getragen, dann kann für den Wert $\frac{y}{1-y} = 1 = 50\%$ Hämolyse auf der Ordinate die genaue Konzentration des lytischen Agens abgelesen werden, die in der gewählten Versuchsanordnung 50% Hämolyse entspricht. Beispiele für solche Titrationsen sind in Abb. 1 bis 4 dargestellt.

8) Radioaktive Markermoleküle:

In den Versuchen wurden folgende radioaktive Markermoleküle verwendet:

1. Trasylol: Proteinaseinhibitor Trasylol^R (Bayer Werke AG⁺)
2. Humanalbumin, trocken "reinst" (Behring Werke/Marburg)
3. Ferritin, Pferdemiß-Ferritin, 2 x kristallisiert, Cadmium-frei, in 10 %iger wässriger Lösung. (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio)

Die nach der Methode von GREENWOOD et al. markierten Substanzen erhielten wir dankenswerterweise von Herrn Dr. Räker aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Giessen. Herr Dr. Räker führte auch die Markierungen aus. Dem Direktor des Pharmakologischen Institutes, Herrn Prof. Dr. E. Habermann, danken wir darüber hinaus für entscheidende Anregungen bezüglich der Versuchsanordnung.

9) Einschleusung radioaktiver Markermoleküle in Erythrozytenschatten:

Die Versuche, die zur Entwicklung optimaler Versuchsbedingungen führten, sind im Ergebnis-Abschnitt beschrieben. Bei den ersten orientierenden Versuchen mit dem Ziel der Einschleusung von Trasylol in Hammel-Erythrozyten hielten wir uns an die Versuchsbedingungen wie sie von PASSOW (1969) für menschliche Erythrozyten angegeben worden sind (50). Als Standardverfahren für die Einschleusung radioaktiver Markermoleküle in Erythrozytenschatten hat sich folgendes Vorgehen bewährt:

Die Beladung der Erythrozytenstromata erfolgte bei 0°C. Die Experi-

+ Versuchsmengen von Trasylol wurden uns dankenswerterweise von den Bayer Werken AG (Dr. E. Truscheit) zur Verfügung gestellt.

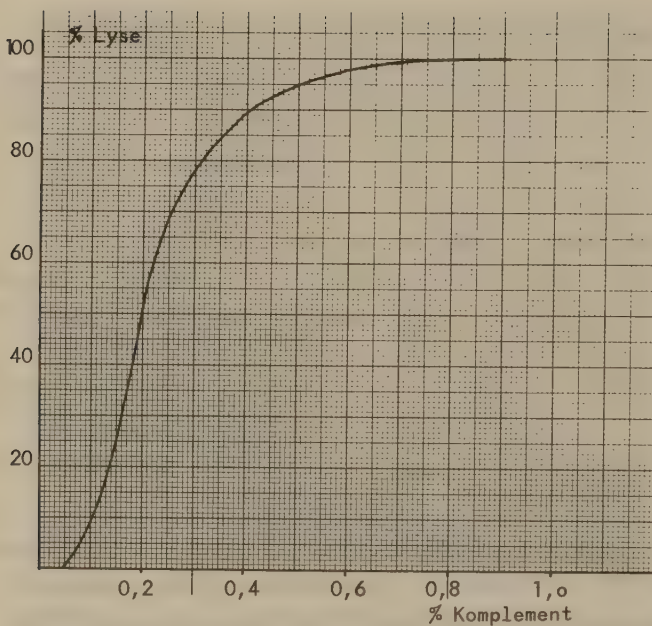


Abb. 1a

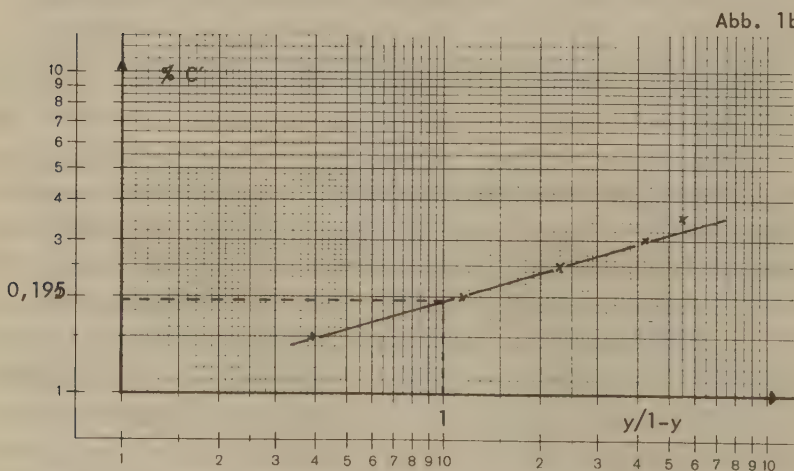


Abb. 1b

Komplement Dosis - Wirkungskurve (Abb.1a) und doppellogarithmische Auftragung der Versuchsergebnisse(Abb.1b) nach MAYER(47), siehe auch Seite 16, Abschnitt III,7.

Abb. 2a

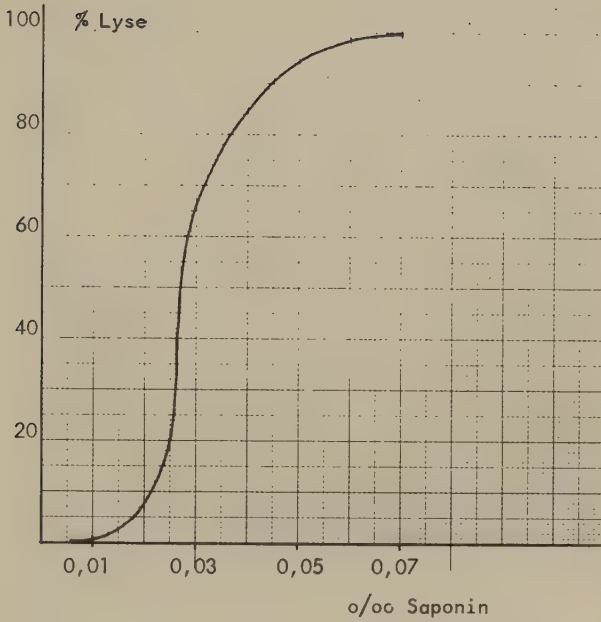
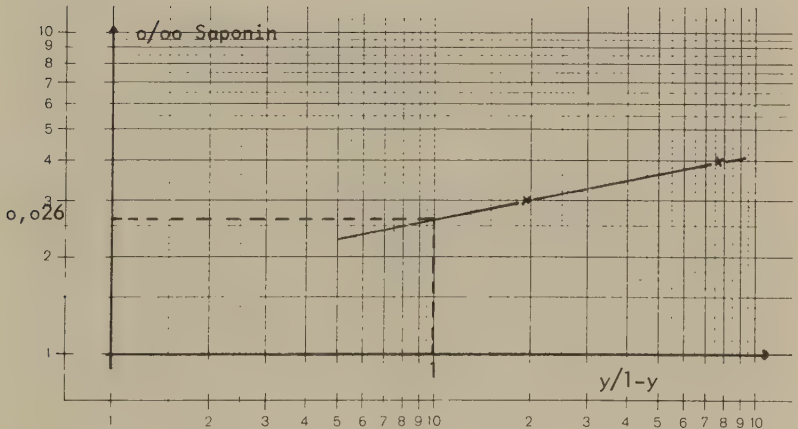
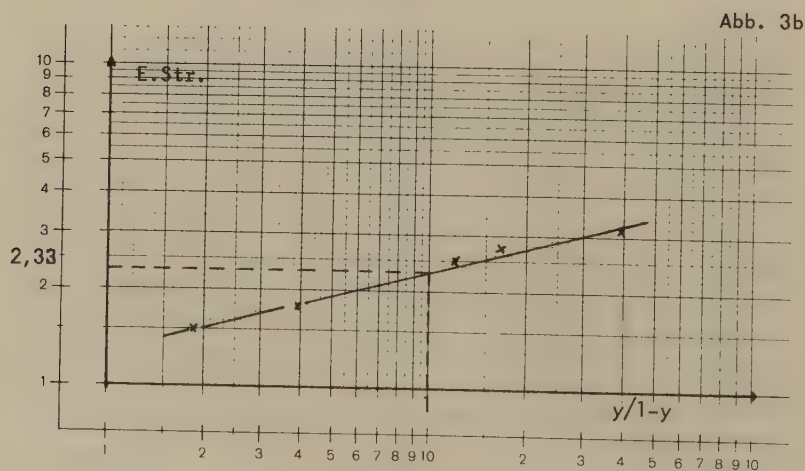
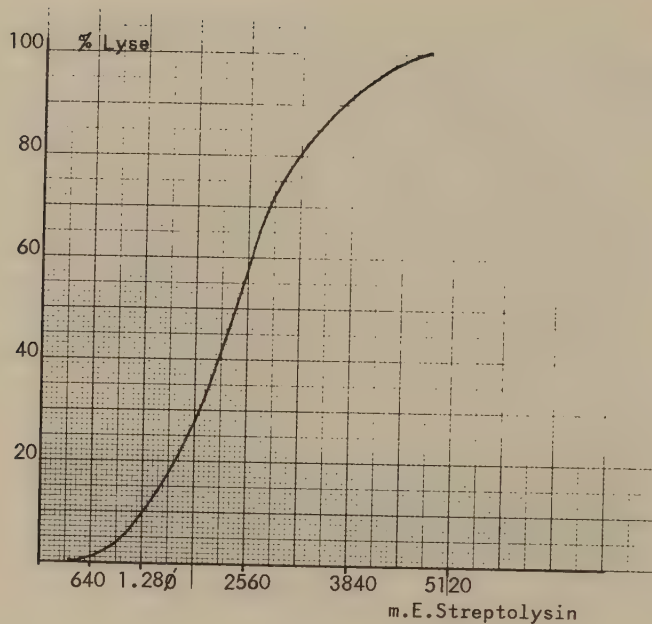


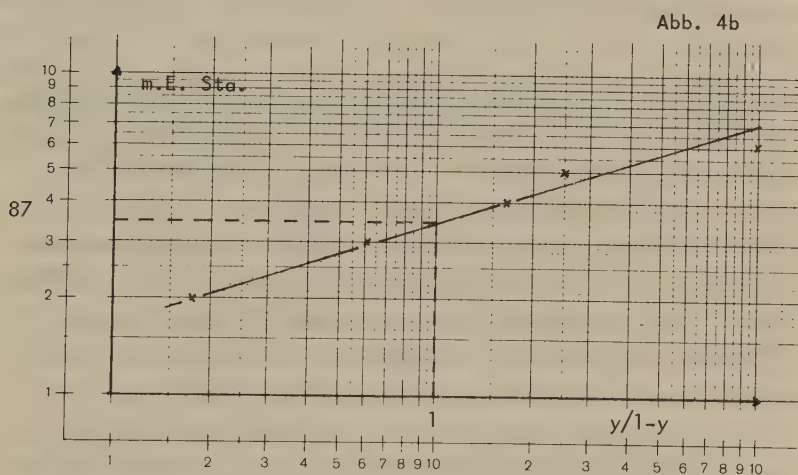
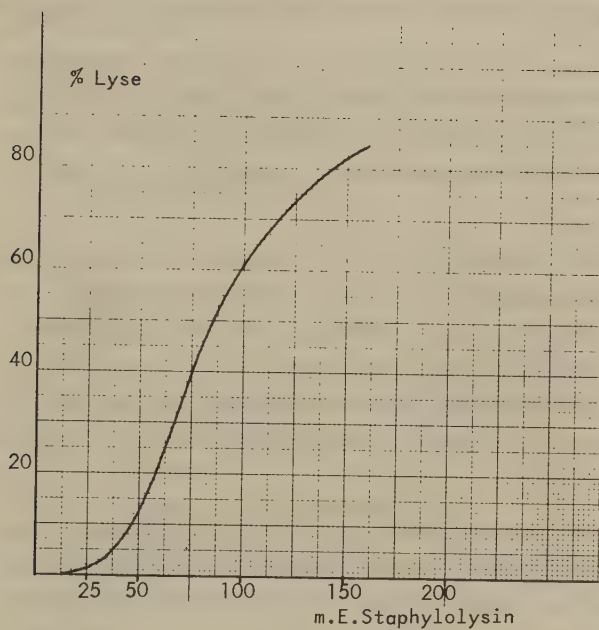
Abb. 2b



Saponin Dosis - Wirkungskurve (Abb.2a) und doppellogarithmische Auftragung der Versuchsergebnisse (Abb.2b) nach MAYER(47), siehe auch Seite 16, Abschnitt III,7.



Streptolysin O Dosis - Wirkungskurve (Abb.3a) und doppellogarithmische Auftragung der Versuchsergebnisse (Abb.3b) nach MAYER(47), siehe auch Seite 16, Abschnitt III,7.



Staphylolysin Dosis - Wirkungskurve (Abb.4a) und doppellogarithmische Auftragung der Versuchsergebnisse(Abb.4b) nach MAYER(47), siehe auch Seite 16, Abschnitt III,7.

mente wurden in einem auf 0°C eingestellten Präzisions-Thermokryostaten durchgeführt. Sämtliche Lösungen waren auf 0°C vorgekühlt.

2,5 ml einer 50 %igen EA-Suspension, die 10^{-4} M kalte Markersubstanz enthielt, wurde mit ca. 300.000 Impulsen/Minute Markersubstanz versetzt. Der Zusatz von kalter Markersubstanz verhindert die unspezifische Absorption von radioaktiver Markersubstanz an die Erythrozyten.

Die Hypotonie wurde innerhalb von 2 - 3 Sekunden durch Zugabe von 8 ml Verdünnungsflüssigkeit (6 ml Aqua dest + 2 ml isotonischem Puffer) erreicht. Nach 20 Sekunden Hypotonie-Dauer wurde durch Zugabe von 2 ml 4-fach konzentriertem Puffer reisosonisiert. Der Versuchsansatz blieb 5 Minuten bei 0°C und wurde dann zur Reversion und Stabilisierung der Stromata 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Stromata wurden anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (16.000 Umdrehungen/Minute, Zentrifugationszeit 2 Minuten) bei Zimmertemperatur 5 x in isotonem Puffer, der 0,5 % Albumin enthielt, gewaschen. Zur Herstellung einer 10 %igen Suspension wurden die Stromata dann in 12,5 ml isotonem Puffer mit 0,5 % Albumin aufgenommen.

Zu 0,3 ml 10 %iger Stromata-Suspension wurden 0,9 ml hämolytisches Agens in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Das Gemisch wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Stromata anschließend in der Eppendorf-Tischzentrifuge scharf zentrifugiert. 1,0 ml Überstand wurde mit einer μl - Pipette sorgfältig abgehebert. Die Radioaktivität von Sediment-Fraktion (0,2 ml) wie auch von Überstand (1,0 ml) wurde im Autogamma-Meßgerät (Firma Packard) 10 Minuten lang gemessen. Zur Bestimmung der Leerwerte liefen in jedem Versuch isotonenfreie, pufferenthaltende Glasröhrchen mit. Die Zahl der Impulse lag pro 0,3 ml Stromata-Suspension nach Abzug der Leerwert-Impulse mindestens bei 2×10^2 Impulsen pro Meßdauer (10 Minuten), häufig aber wesentlich höher.

IV. Ergebnisse

A) Bestimmung optimaler Versuchsbedingungen für die Einschleusung von radioaktiven Markermolekülen

a) Einschleusung von Trasylol

Die Hypotonie-Dauer wurde zwischen 10 Sekunden und 45 Minuten variiert. Gemessen wurde zunächst die Sediment-Aktivität nach Einschleusung von radioaktivem Trasylol in 2/5 isotonem Milieu (Versuchsansatz a, Tab. 1). Nach entsprechender Hypotonie-Dauer wurden durch Zusatz von Kochsalzlösung sofort wieder isotone Verhältnisse hergestellt. Als Kontrollansatz wurden Erythrozyten in isotonem Milieu mit radioaktivem Trasylol inkubiert und das an die Erythrozyten gebundene Trasylol im Sediment bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Stroma bereits nach einer Hypotonie-Dauer von 10 Sekunden 12,9 % der eingesetzten Trasylol-Aktivität enthalten. Dieser Wert nimmt bei längerer Hypotonie-Dauer wieder ab. In isotonem Milieu werden an die Erythrozyten nicht mehr als 0,2 bis 0,3 % der eingesetzten Aktivität gebunden. Dieses Resultat zeigt, daß eine Hypotonie-Dauer von 10 Sekunden ausreicht, um eine maximale Beladung von Stroma mit Trasylol zu erreichen.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Beladung von Hammel-Erythrozytenströma mit Trasylol-J¹²⁵ von der Hypotonie-Dauer (Versuch 1).

Hypotonie- Dauer	Sedimentaktivität ¹⁾	
	Versuchsansatz a 2/5 isoton. Milieu	Kontrollansatz isotones Milieu
10 sec.	12,9	0,2
1 min.	11,9	0,3
10 min.	9,2	0,1
45 min.	8,0	0,2

1) Die Sedimentaktivitäten sind in Prozent (%) der eingesetzten Gesamtaktivität angegeben.

Im nächsten Versuch (Versuch 2, siehe Tabelle 2) wurde Trasylol- J^{125} den Hammel-Erythrozytenstroma in hypotonem Milieu 5 Minuten nach erfolgter Hämolyse bei 0°C zugesetzt. Zu verschiedenen Zeiten nach dem Zusatz von radioaktivem Trasylol wurden dem Ansatz Proben entnommen, reisotonisiert und durch Inkubation für 1 Stunde bei 37° (Reversion) stabilisiert. Die in der Tabelle 2 angegebenen Werte sind die Sedimentaktivitäten, ausgedrückt in Prozent (%) der eingesetzten Gesamtaktivität.

Es zeigt sich, daß die Stroma, die 5 Minuten im hypotonem (2/5 isotonem) Milieu waren und eine weitere Minute in Gegenwart von Trasylol- J^{125} gehalten wurden, noch 5,7 % der eingesetzten Trasylol-Aktivität aufnehmen. Mit weiterer Inkubationsdauer in hypotonem Milieu nimmt die Sedimentaktivität fortlaufend ab. Dies hängt vermutlich mit einer zunehmenden Schädigung der Stromamembranen durch die Hypotonie zusammen.

Setzt man erst nach Reisotonisierung und Stabilisierung (Reversion durch Inkubation der Stroma über 45 Minuten bei 37°C) den Stroma radioaktives Trasylol- J^{125} zu (Versuch 3), so findet man, daß nur Spuren von Trasylol in die Stroma eindringen. Die Werte von 0,7 bis 0,9 % Sedimentaktivität liegen nur wenig über den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Die überwiegende Mehrzahl der reisotonisierten und stabilisierten Stroma ist dicht für von außen eindringendes Trasylol geworden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Eindringen von Trasylol-J¹²⁵ in Hammelerythrozytenstroma in hypotonem Milieu (Versuch 2) und nach Reisotonisierung und Stabilisierung (Versuch 3).

Zeit der Probenentnahme ¹⁾	Sedimentaktivität ²⁾	
	Versuch 2	Versuch 3
1 min.	5,7	0,7
10 min.	5,4	0,9
30 min.	4,8	0,8
45 min.	4,2	0,7
60 min.	3,5	-

1) Siehe Text

2) Siehe Fußnote Tabelle 1

Der Wert des von PASSOW (1969) angegebenen Stabilisierungsverfahrens (Reversion) durch nachträgliche Inkubation der reisotonisierten Stromata über 1 Stunde bei 37° ergab sich in den folgenden, analog zu Versuch 1 bis Versuch 3 durchgeführten Experimenten, bei denen auf eine Stabilisierung verzichtet wurde.

In Versuch 4 wurde Trasylol-J¹²⁵ vor der hypotonen Lyse (2/5 isoton., 0°) zugesetzt. Der Versuch 5 ist der entsprechende Kontrollansatz in isotonem Milieu. Bei Versuch 6 erfolgte der Zusatz von Trasylol-J¹²⁵ nach vorausgegangener 5 Minuten langer Hypotonie. Der Versuch 7 zeigt eine Kontrolle mit Stromata nach Reisotonisierung, aber ebenfalls ohne stabilisierende Nachinkubation.

Die Werte in Tabelle 3 für die Versuche 4 bis 7 verhalten sich ganz analog zu den Ergebnissen von Versuch 1 bis 3, nur liegen die Sedimentaktivitäten in allen Fällen niedriger. Besonders der Versuch 4 zeigt einen wesentlich stärkeren Abfall der Sedimentaktivitäten bei zunehmender Hypotonie-Dauer im Vergleich zu Versuch 1. Daraus geht klar hervor, daß die Nachinkubation in isotonem Milieu über 1 Stunde (Reversion) wesentlich zur Stabilisierung der Stromamembranen beiträgt.

Tabelle 3

Beladung von Hammel-Erythrozytenstroma mit Trasytol-J¹²⁵ ohne
nachfolgende Stabilisierung (Reversion) durch Nachinkubation
bei 37° für eine Stunde.

Zeit der Proben- entnahme ¹⁾	Sedimentaktivität ²⁾			
	Versuch 4	Versuch 5 (Kontr.)	Versuch 6	Versuch 7
10 sec.	8,0	0,3	2,5	0,5
1 min.	4,5	0,7	4,4	0,2
10 min.	3,6	0,2	4,4	0,4
30 min.			3,7	0,1
45 min.	2,8	0,3	4,0	0,6

1) siehe Text

2) siehe Fußnote Tabelle 1

Versuch 4: Zugabe von Trasytol-J¹²⁵ vor der hypotonen Hämolyse

Versuch 5: Kontrollansatz mit Erythrozyten in isotonem Milieu

Versuch 6: 5 Minuten Hypotonie, dann Zugabe von Trasytol-J¹²⁵

Versuch 7: Zugabe: Zugabe von Trasytol-J¹²⁵ nach hypotoner Hämolyse und Reisotonisierung.

b) Einschleusung von Albumin in Hammel-Erythrozytenstroma

In einer ähnlichen Versuchsanordnung wurde die Einschleusung von Albumin-J¹²⁵ in Hammel-Erythrozytenstroma in Abhängigkeit von Hypotonie-Dauer und Hypotonie-Grad geprüft. Bei Versuch 8 wurde Albumin-J¹²⁵ vor und bei Versuch 9 15 Minuten nach Hämolysebeginn zugesetzt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt. Es ergibt sich, daß die höchsten Sedimentaktivitäten in 2/5 isotonem Milieu und nach einer Einschleusungsdauer von 1-10 Minuten gemessen wurden. Kürzere oder längere Hypotonie-Dauer sowie geringere oder höhere Ionenkonzentration als einem 2/5 isotonem Milieu entspricht, hatte geringere Sediment-Aktivitäten zur Folge.

Nach diesen Versuchen läßt sich für die Einschleusung von Albumin eine optimale Hypotonie-Dauer annehmen, die unter 10 Minuten liegt. Die optimale Hypotonie-Dauer für die Einschleusung ist etwas länger als die für Trasylol. Das mag mit dem, im Vergleich zu Trasylol, etwas höheren Molekulargewicht des Albumins zusammenhängen.

Versuch 9 zeigt erneut, daß eine Hypotonie-Dauer von 15 Minuten die Stromamembranen schädigt und zu geringeren Sedimentaktivitäten als in Versuch 8 führt. Immerhin liegen die Werte für Stroma, die in hypotonem Milieu (1/5 und 3/5 isoton) mit Albumin-J¹²⁵ inkubiert waren, deutlich höher als die Werte des Kontrollansatzes, der nach der Hypotoniephase von 15 Minuten reisonisiert und dann mit Albumin-J¹²⁵ versetzt worden war. Hieraus kann man schließen, daß die Membranen der Stroma in hypotonem Milieu bis zu einem gewissen Grad für Albumin durchlässig bleiben.

Tabelle 4

Versuch 8: Einschleusung von Albumin-J¹²⁵ in Hammel-Erythrozytenstroma in Abhängigkeit von Hypotonie-Dauer und Hypotonie-Grad.
Zugabe von Albumin-J¹²⁵ vor der Hämolyse.

Hypotonie-Dauer	Sedimentaktivität ¹⁾ Hypotoniegrad ²⁾			
	1/5	2/5	3/5	5/5
10 sec.	2,9	2,9	2,6	0,3
1 min.	3,5	4,2	3,4	0,2
10 min.	3,7	4,2	4,3	0,3
30 min.	3,7	4,1	4,1	0,4

1) Siehe Tabelle 1

2) Der Hypotonie-Grad während der Hämolyse ist in Bruchteilen von 1 angegeben. Isotonie hat den Wert 1.

Tabelle 5

Versuch 9: Einschleusung von Albumin-J¹²⁵ in Hammel-Erythrozyten in Abhängigkeit von Inkubationsdauer mit Albumin-J¹²⁵ und Hypotoniegrad. Zugabe von Albumin-J¹²⁵ 15 Minuten nach Hämolysebeginn.

Inkubations- dauer mit Albumin-J ¹²⁵	Sedimentaktivität Hypotoniegrad		
	1/5	3/5	5/5
10 sec.	1,3	1,3	0,3
1 min.	1,2	1,3	0,7
10 min.	1,8	1,8	0,5
30 min.	2,0	2,7	1,0
45 min.	2,6	3,3	0,8

c) Einschleusung von Ferritin-J¹²⁵ in Hammelerythrozytenstroma

Ferritin-J¹²⁵ läßt sich ebenso wie Trasylol und Albumin in Hammelerythrozytenstromata einschleusen (Tab. 6, Versuch 10). Ferritin-J¹²⁵ wurde vor der Hämolyse in 2/5 isotonem Milieu der Erythrozyten-Suspension zugesetzt (Versuch 10 a). Die Hypotoniedauer wurde auf 20 Sekunden begrenzt und die Stroma-Suspension anschließend durch Zusatz von Kochsalzlösung sofort wieder reisonisiert. Die Stroma-Membranen wurden durch Inkubation bei 37°C über 1 Stunde (Reversion) stabilisiert.

Im Kontrollansatz (Versuch 10 b) wurden Stromata nach Reisonisierung und Reversion, bzw. Erythrozyten (Versuch 10 c) mit Ferritin-J¹²⁵ inkubiert.

Der Versuch zeigt, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen bis zu 2,5 % der eingesetzten, an Ferritin gebundenen Radioaktivität in die Stromata eingeschleust werden können. Stabilisierte Stromata sind in isotonem Milieu offenbar dicht für Ferritin. Nur 0,25 % der eingesetzten Radioaktivität wurde an die Stroma gebunden. Dieser Wert liegt niedriger als der für die Absorption von Ferritin an Erythrozyten im Puffermilieu (Versuch 10 c).

Löst man die Hämolyse nicht mit Wasser, sondern mit Komplement an sensibilisierten (mit Forssman Antikörpern beladenen) Erythrozyten (EA) aus (Versuch 11), so findet man, daß auch 0,65 bis 0,89 % der eingesetzten Aktivität im Sediment verbleiben (Versuch 11). Werte in der gleichen Größenordnung ergeben sich bei der Inkubation der EA mit hitzeinaktiviertem Komplement. Hier bleibt naturgemäß die Immunchämolyse aus. Die Werte repräsentieren die Bindung von Ferritin an Erythrozyten bzw. Stromata in Gegenwart von Serum-Proteinen.

Tabelle 6

Einschleusung von Ferritin-J¹²⁵ in Hammelerythrozyten (Versuch 10)

	Radioaktivität ¹⁾		
	Versuch 10 a	Versuch 10 b	Versuch 10 c
Sediment	2,5	0,24	0,65
	2,2	0,27	0,67
Überstand	97,4	99,7	99,3
	97,7	99,7	99,3

Versuch 10 a: Zugabe von Ferritin-J¹²⁵ vor der hypotonen Hämolyse
(2/5 isoton, 20 Sek., mit Reversion)

Versuch 10 b: Zugabe von Ferritin-J¹²⁵ zu Stromata nach Reisotonisierung und Reversion.

Versuch 10 c: Kontrollansatz mit Erythrozyten in isotonem Milieu.

1) Es sind jeweils die Werte für Doppelbestimmungen angegeben.

Tabelle 7

Bindung von Ferritin-J¹²⁵ an sensibilisierte Hammelerythrozyten in Gegenwart von aktivem bzw. hitzeinaktiviertem Komplement (Versuch 11)

Radioaktivität ¹⁾				
Komplement CH ₅₀ -Einheiten				
	2	10	50	hitzeinakti- viertes Komplement
Sediment	0,68	0,65	0,85	0,89
	0,92	0,63	0,76	0,88
Überstand	99,3	99,3	99,1	99,1
	99,0	99,2	99,3	99,1

1) Es sind jeweils die Werte für Doppelbestimmungen angegeben.

B) Die Freisetzung radioaktiver Markermoleküle aus Erythrozytenstromata unter der Einwirkung verschiedener hämolytischer Agenzien

a) Die Wirkung von Hypotonie auf Stromata

In Bestätigung der Beobachtungen von BETKE und KLEIHAUER (1964) fanden wir, daß man in hypotonem Milieu einmal eingeschleuste Markermoleküle (u. a. Albumin) aus den Stromata nahezu vollkommen wieder auswaschen kann. Dieser Befund spricht dafür, daß in hypotonem Milieu in der Stroma-Membran Defekte, bzw. Dehiszenzen vorhanden sind, durch die Albumin nach außen austreten kann. Es ergab sich die Frage, wie schnell dieser Prozeß der Lochbildung an Stromata unter der Hypotonie einsetzt.

Der folgende Versuch sollte darüber Aufklärung geben. Mit Albumin-Jod¹²⁵ beladene Stromata wurden zu einer 50 %igen Suspension in Veronalpuffer aufgeschwemmt, der 2,5 % kaltes Albumin enthielt. Der Zusatz von kaltem Albumin verhindert die unspezifische Absorption von radioaktivem Albumin an die Stromata. 1 ml 50 %ige Stroma-Suspension wurde zur Schaffung von 1/5 isotonen Bedingungen mit 4 ml aqua bidest versetzt. Nach 10 Sekunden bis 45 Minuten wurden dem Versuchsansatz 1,0 ml Proben entnommen und mit 0,4 ml konzentrierter Pufferlösung reisosonisiert; 1,0 ml dieser Mischung wurden dann scharf zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 16.000 RPM, 2 Minuten) und die Aktivität in 0,5 ml Überstand und 0,5 ml Sedimentfraktion getrennt gemessen.

Analoge Versuche wurden unter 3/5 isotonen, bzw. isotonen Bedingungen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 (Versuch 12)

Austritt von Albumin-Jod¹²⁵ aus Erythrozytenstromata während Hypotonie von verschieden langer Dauer.

Hypotonie-Dauer	Sedimentaktivität +	
	Hypotonie-Grad	
	1/5	3/5
10 Sekunden	16	25
1 Minute	8	10
10 Minuten	1	3
30 Minuten	1	1
45 Minuten	1	1
		5/5
		70
		72
		62
		70
		59

+ Die Sedimentaktivität ist in % der Gesamtaktivität eines Röhrchens unter Berücksichtigung der Aktivität des Überstandes errechnet worden.

Unter $1/5$ isotonen Bedingungen befindet sich bereits nach 10 Sekunden nur mehr 16 % der ursprünglich in den Stromata vorhanden gewesenen Radioaktivität in den Stromata. Nach 10 Minuten langer Hypotonie sinkt dieser Wert auf unter 1 % ab. Auch unter $3/5$ isotonen Bedingungen finden sich nach 30 Minuten weniger als 1 % der Aktivität in den Stromata. Die Stromata der Kontrollansätze enthalten zu den gleichen Zeiten 60 - 70 % der Gesamtaktivität. Die Aktivität der Kontrollansätze sollte eigentlich zwischen 98 und 100 % liegen. In diesen Versuchen wurden aber 2 Tage alte, beladene Stromata verwendet, so daß sicher eine gewisse Schädigung der aufbewahrten Stromata angenommen werden muß. Immerhin läßt der Versuch klar erkennen, daß es unter Hypotonie innerhalb von Sekunden zu einem erheblichen Austritt von intrazellulärem Inhalt in das umgebende Milieu kommt und damit zu einem Absinken der Sediment-Aktivität bzw. zu einem entsprechenden Anstieg der Radioaktivität im Überstand. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Schlußfolgerung, die bereits aus Versuch 9 gezogen wurde, nämlich, daß unter Hypotonie die Erythrozytenmembran sehr rasch für Moleküle von der Größe des Albumin-Moleküls durchlässig werden.

b) Die Wirkung von Komplement, Saponin, Streptolysin 0 und
Staphylolysin auf Erythrozytenstromata

In den folgenden Versuchen sollte die Wirkung mehrerer hämolytischer Agenzien, d. h. Komplement, Saponin, Streptolysin 0 und Staphylolysin auf Erythrozytenstromata untersucht werden. Zunächst wurde die Wirkung der genannten hämolytischen Agenzien auf Stromata geprüft, die mit Trasylol-J¹²⁵ beladen worden waren.

1) Die Freisetzung von Trasylol-J¹²⁵

Die Beladung der Erythrozytenstromata sowie der weitere Ablauf des Versuchs erfolgte entsprechend der Versuchsanordnung, wie sie im Abschnitt Material und Methoden auf Seite 15 angegeben wurde.

Die Experimente wurden in einem auf 0°C eingestellten Präzisions-thermokryostaten durchgeführt, sämtliche Reaktionspartner waren auf 0°C vorgekühlt.

2,5 ml einer 50 %igen EA-Suspension, die 10^{-4} molar kaltes Trasylol enthält, wurde mit ca. 300.000 Impulsen pro Minute Trasylol-Jod¹²⁵ versetzt. Der Zusatz von kaltem Trasylol verhindert die unspezifische Adsorption von radioaktivem Trasylol an die Erythrozyten.

Die Hypotonie wurde innerhalb von 2-3 Sekunden durch Zugabe von 8 ml Verdünnungsflüssigkeit (6 ml aqua dest + 2 ml isotonischem Puffer) erreicht. Nach 20 Sekunden Hypotoniedauer wurde durch Zugabe von 2 ml 4-fach konzentriertem Puffer reisonisiert. Der Versuchsansatz blieb 5 Minuten bei 0°C und wurde dann zur Reversion und Stabilisierung der Stromata 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Stromata wurden anschließend in einer Eppendorf Tischzentrifuge (16.000 RPM, 2 Minuten) bei Zimmertemperatur 5 x in isotonem Puffer, der 0,5 % Albumin enthielt, gewaschen.

Zur Herstellung einer 10 %igen Suspension wurden die Stromata dann in 12,5 ml isotonem Puffer mit 0,5 % Albumin aufgenommen.

Zu 0,3 ml 10 %iger Stromata-Suspension wurden 0,9 ml hämolytisches Agens in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Das Gemisch wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Stromata anschließend in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. 1 ml Überstand wurde mit einer Mikroliterpipette sorgfältig abgehebert. Die Radioaktivität von Sedimentfraktion (0,2 ml) wie auch von Überstand (1,0 ml) wurde im Autogamma-Meßgerät (Firma Packard) 10 Minuten lang gemessen. Zur Bestimmung der Leerwerte liefen in jedem Versuch isotopenfreie, Puffer enthaltende Glasröhrchen mit. Die Zahl der Impulse lag pro 0,3 ml Stromata-Suspension nach Abzug der Leerwertimpulse mindestens bei 2×10^2 Impulsen pro Meßdauer (10 Minuten), häufig aber wesentlich höher.

Die Wirkung hämolytischer Agenzien auf Stromata, die mit Trasylo-Jod¹²⁵ beladen waren, ist in Tabelle 9 dargestellt. Die Tabelle läßt erkennen, daß es in Abhängigkeit von der Dosis der verwendeten hämolytischen Agenzien unter der Einwirkung von Komplement und Saponin zu einer vollständigen Freisetzung des anfangs intrazellulär vorhandenen Trasylo-Jod¹²⁵ kommt. Nach der Einwirkung von 8 CH₅₀ Einheiten Komplement beträgt die Restradioaktivität im Sediment weniger als 20 %. Ein Wert unter 20 % Restradioaktivität im Sediment wird bereits nach der Einwirkung von 3 hämolytischen Einheiten Saponin erreicht.

In der gewählten Versuchsanordnung werden 1,0 ml Überstand und 0,2 ml Sediment gemessen. Bei einem kompletten Austritt intrazellulären Inhalts aus den Stromata, d. h., bei einer gleichmäßigen Verteilung der Radioaktivität auf Überstand und Sedimentfraktion, würden sich folglich 5/6 der Radioaktivität im Überstand und 1/6 = 16,65 % im Sediment befinden. Eine Restaktivität von 16 - 17 % in der Sedimentfraktion entspricht daher einer 100 %igen Hämolyse bzw. vollständigen Freisetzung von Zellinhalt.

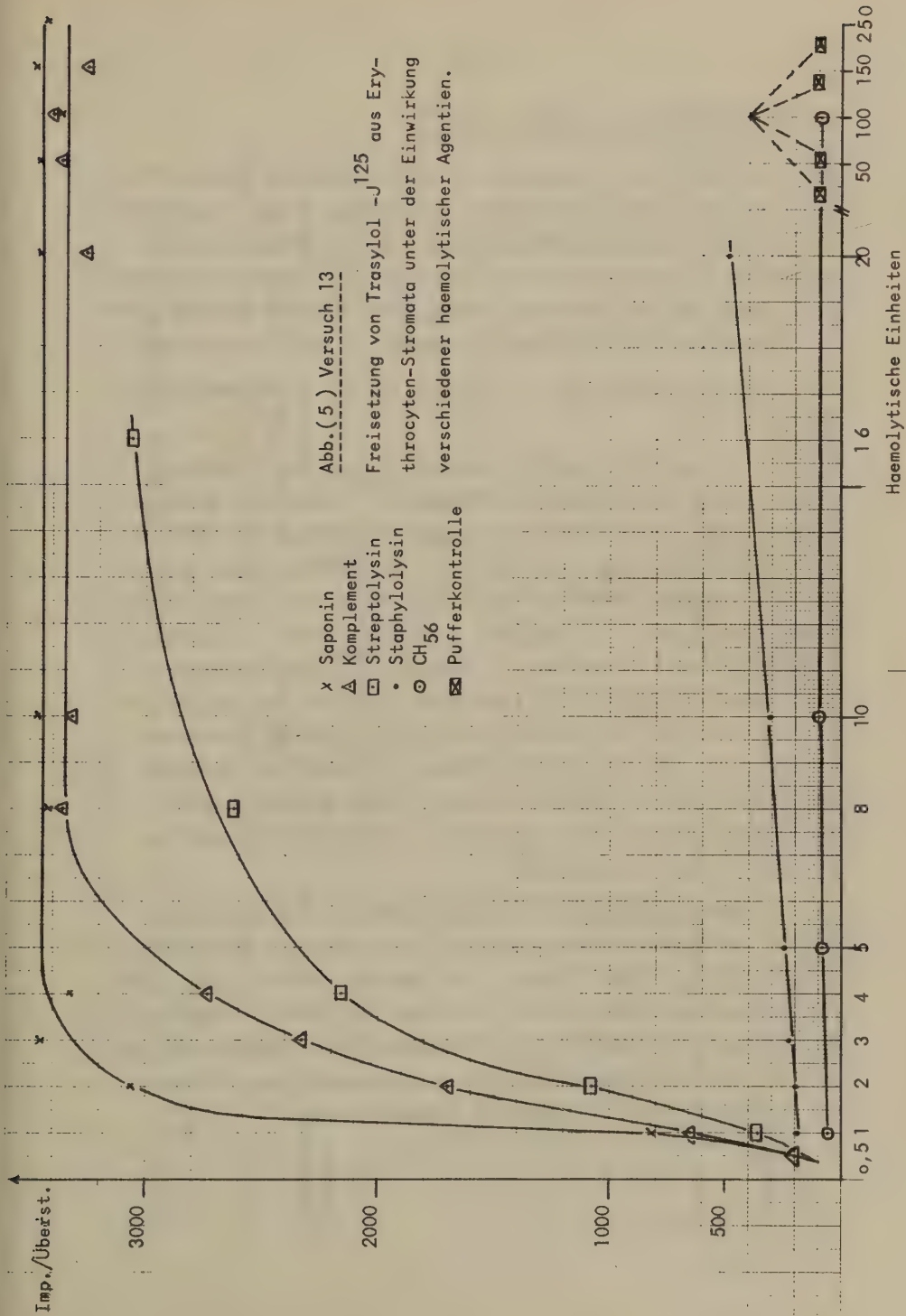
Die Kontrollansätze mit Puffer zeigen, daß 97 - 98 % der in den Stromata enthaltenen Aktivität mit dem Sediment niedergeschlagen werden. Unter der Einwirkung von hitzeinaktiviertem Komplement kommt es ebenfalls nicht zu einer Freisetzung von Zellinhalt, 98 % der Aktivität befinden sich im Sediment. Die membranschädigende Wirkung von Streptolysin ist schwächer als die von Saponin und Komplement. Aber nach Einwirkung von 16 hämolytischen Einheiten Streptolysins befinden sich nur mehr 24 % der Radioaktivität im Sediment. Auch unter der Einwirkung von Streptolysin werden daher die Stromatamembranen durchlässig. Besonders bemerkenswert ist die geringe membranschädigende Wirkung von Staphylolysin auf Schafserythrozyten-Membranen. Selbst nach der Einwirkung von 20 H₅₀-Einheiten Staphylolysin werden immer noch nahezu 90 % der Aktivität im Sediment niedergeschlagen. Entsprechend gering ist die Radioaktivität im Überstand. Das Ergebnis von Versuch 13 ist in Abb. 5 anhand der Aktivität der Überstände noch einmal grafisch dargestellt.

Tabelle 9 (Versuch 13)

Austritt von Trasylol-Jod¹²⁵ aus Erythrozyten-Stromata unter der Wirkung von Komplement, Saponin, Streptolysin und Staphylolysin

Hämolytische Einheiten	Radioaktivität in der Sedimentfraktion (0,2 ml) +			
	C'	Ch ₅₆	Saponin	Streptolysin
0,5	95			
1,0	85	98	81	92
2,0	61		25	74
3,0	43		17	
4,0	33	98	18	47
8,0	19		16	35
10,0	19	98	15	
20,0	19		15	24
50,0	18		16	
100,0	18	98	17	
150,0	21		15	
250,0	16		16	
Pufferkontrolle	98	98	97	97
				98

+ siehe Tabelle 1



2) Die Freisetzung von Albumin-Jod¹²⁵

Die Beladung der Erythrozytenstroma erfolgte nach der gleichen Methodik wie sie in Abschnitt IV, B, b 1 beschrieben wurde. Zu 2,5 ml einer 50 %igen EA Suspension, die 2,5 % kaltes Albumin enthielt, wurden 400.000 Impulse pro Minute Albumin-J¹²⁵ zugesetzt. Hyotoniegrad, Hypotoniedauer, Reisonisierung, Reversion und Herstellung der Stromasuspension und hämolytischer Ansatz wie zuvor beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Tab. 10 (Versuch 14) und in Abbildung (6) dargestellt.

Nur zwei hämolytische Agenzien, nämlich Saponin und Streptolysin, führen zu einer Freisetzung von Albumin-J¹²⁵. Schon drei Einheiten Saponin reichen aus, um eine vollständige Freisetzung von Albumin-J¹²⁵ zu bewerkstelligen. Mit 4 bzw. 8 E Streptolysin 0 wird ein Austritt intrazellulärer Albuminmoleküle erreicht, der 66 % bzw. 75 % Hämolyse entspricht. Im Gegensatz zu Versuch 13 kann mit aktivem Komplement keine Freisetzung von Albumin-J¹²⁵ ausgelöst werden. Die Sedimentaktivitäten liegen dementsprechend fast alle oberhalb von 96 % (s. Tab. 10), es wird kaum Radioaktivität in den Überständen gemessen (s. Abb. (6)). Es besteht kein Unterschied zu den Werten für hitzeinaktiviertes Komplement, bzw. zu den Pufferkontrollen. Staphylolysin erwies sich in Bezug auf die Freisetzung radioaktiven Albumins als nahezu unwirksam.

Aus den bisher beschriebenen Versuchen kann der Schluß gezogen werden, daß Saponin und Streptolysin 0 in den Stromata-Membranen so umfangreiche Löcher erzeugen, daß Albumin austreten kann. Komplement erzeugt offenbar kleinere Läsionen, da Trasylol unter Komplementeinwirkung austritt, Albumin hingegen nicht. Staphylolysin muß noch diskretere Läsionen setzen, da weder Trasylol noch Albumin aus den Stromata in das umgebende Medium gelangen.

Tabelle 10 (Versuch 14)

Austritt von Albumin-J¹²⁵ aus Erythrozyten-Stromata unter der Wirkung von Komplement, Saponin, Streptolysin und Staphylolysin

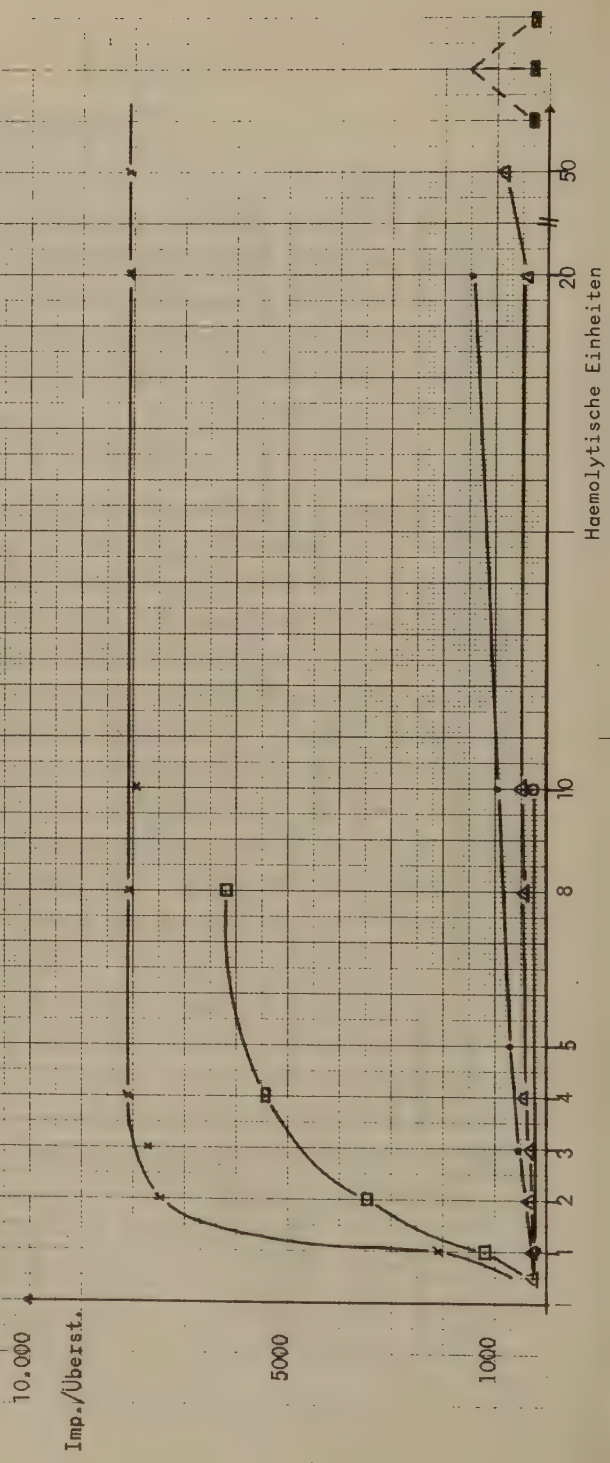
Hämolytische Einheiten	Radioaktivität in der Sedimentfraktion (0,2 ml) +			
	C'	Ch ₅₆	Saponin	Streptolysin Staphylolysin
0,5	97			
1,0	97	97	73	88 97
2,0	96		25	65 96
3,0	97		18	
4,0	96		27	44 93
8,0	96		20	37
10,0	95	97	17	
20,0	96		16	
50,0	91		17	
Pufferkontrolle	97		98	98

+ Prozent (%) der Gesamtaktivität des Ansatzes

- x Saponin
- Streptolysin
- Staphylolysin
- △ Komplement
- CH₅₀
- ⊠ Pufferkontrollen

Abb. (6) Versuch 14

Freisetzung von Albumin -J¹²⁵ aus Erythrocyten-
Stromata unter der Einwirkung verschiedener hae-
molytischer Agentien.



3) Die Freisetzung von Ferritin-Jod¹²⁵

In Versuch 15 wurde die Freisetzung von Ferritin-J¹²⁵ aus Erythrozyten-Stromata unter der Einwirkung von Komplement, hitzeinaktiviertem Komplement, Saponin, Streptolysin 0 und Staphylolysin sowie im Puffermilieu geprüft. Der Versuchsansatz entsprach in allen Details den bisher beschriebenen Versuchen 13 und 14 (s. Abschnitt IV, B, b 1 und 2).

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 11 und Abb. (7) aufgeführt.

Erwartungsgemäß setzen Saponin und Streptolysin aus den Erythrozyten-Stromata das eingeschlossene radioaktive Ferritin weitgehend frei. Überraschend ist in diesem Versuch die Wirkung von aktivem Komplement, das zu einem Austritt von radioaktivem Ferritinmaterial aus den Stromata führt. Die Freisetzung läuft auf ein Plateau aus, das etwa einer 30 %igen Hämolyse entspricht. Es wird kaum Radioaktivität durch Staphylolysin und CH₅₆ freigesetzt.

4) Die Freisetzung von Trasylol-J¹²⁵, Albumin-J¹²⁵ und Ferritin-J¹²⁵ unter der Einwirkung von Komplement

Der Versuch 16 wurde speziell zur Untersuchung der lytischen Aktivität des Komplementes durchgeführt.

Ausgehend von der gleichen Erythrozyten-Charge wurden in getrennten Versuchsansätzen am gleichen Tag unter gleichen Bedingungen die Markersubstanzen Trasylol, Albumin und Ferritin verwendet und ihr Austritt unter der Einwirkung von aktivem bzw. inaktivem Komplement überprüft. Die methodischen Einzelheiten ergeben sich aus der Beschreibung von Versuch 13 bis 15.

Eine Darstellung der Versuchsergebnisse findet sich in Tabelle 12 und Abb. (8). 8 CH₅₀ Einheiten Komplement reichen aus, um eine vollständige Freisetzung von Trasylol aus den Erythrozytenschatten zu

Tabelle 11 (Versuch 15)

Austritt von Ferritin-J¹²⁵ aus Erythrozyten-Stromata unter der Wirkung von Komplement (C'), hitze-inaktiviertem Komplement (CH₅₆), Saponin, Streptolysin und Staphylolysin

Hämolytische Einheiten	Radioaktivität in der Sedimentfraktion (0,2 ml)				
	C'	CH ₅₆	Saponin	Streptolysin	Staphylolysin
0,5	99	95	99		
1,0	96	98	80	73	97
2,0	90		30	69	97
3,0	82		32		96
4,0	85		31	55	95
8,0	74		25	47	
10,0	81	97	31	47	89
20,0	79		22	39	86
50,0	100		32	39	
100,0	79	96	25		
150,0	75		26		
Pufferkontrolle	97		97		99

x Saponin

□ Streptolysin

△ Komplement

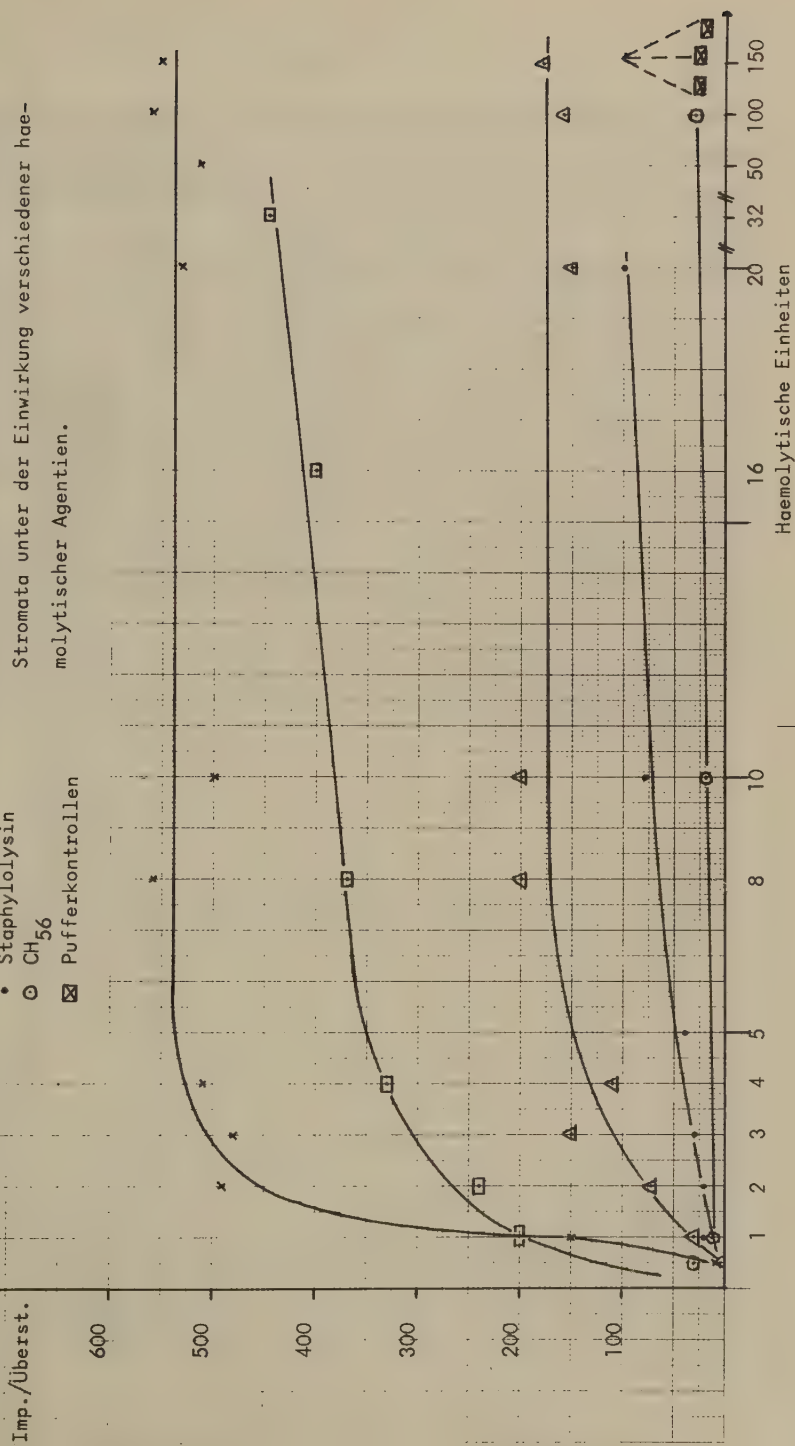
• Staphylolysin

○ CH₅₆

⊠ Pufferkontrollen

Abb. (7) Versuch 15

Freisetzung von Ferritin -J¹²⁵ aus Erythrocyten-Stromata unter der Einwirkung verschiedener haemolytischer Agentien.



bewirken. Albumin bleibt auch nach Einwirkung höchster Komplementkonzentrationen vollständig in den Stromata eingeschlossen. Es kommt zu einer geringen, aber doch deutlichen Freisetzung von Ferritin, die etwa einer 25 %igen Hämolyse entspricht.

Dieser Befund ist unerwartet, da Ferritin mit einem Molekulargewicht von ca. 500 000 und einem Moleküldurchmesser von ca. 125 Å unter Komplement-Einwirkung vollständig in den Erythrozyten-Stromata eingeschlossen bleiben sollte, wie Albumin mit einem Molekulargewicht von 69.000 und einem Moleküldurchmesser von 74 Å. Wahrscheinlich enthielt die benutzte Ferritinpräparation niedermolekulare, aber nicht dialysierbare Fragmente, die entweder von vornherein im Ferritin vorhanden waren oder bei der Markierung des Ferritins mit Jod¹²⁵ entstanden sind. Das würde erklären, weshalb unter der Einwirkung von Komplement ein Teil der an Ferritin gebundenen Radioaktivität die Erythrozyten verließ. Diese Annahme hat sich in Gelfiltrationsversuchen (M. BETHGE, 1974) bestätigt. Im übrigen bestätigt der Versuch 16 die Ergebnisse der Versuche 13 bis 15.

Tabelle 12 (Versuch 16)

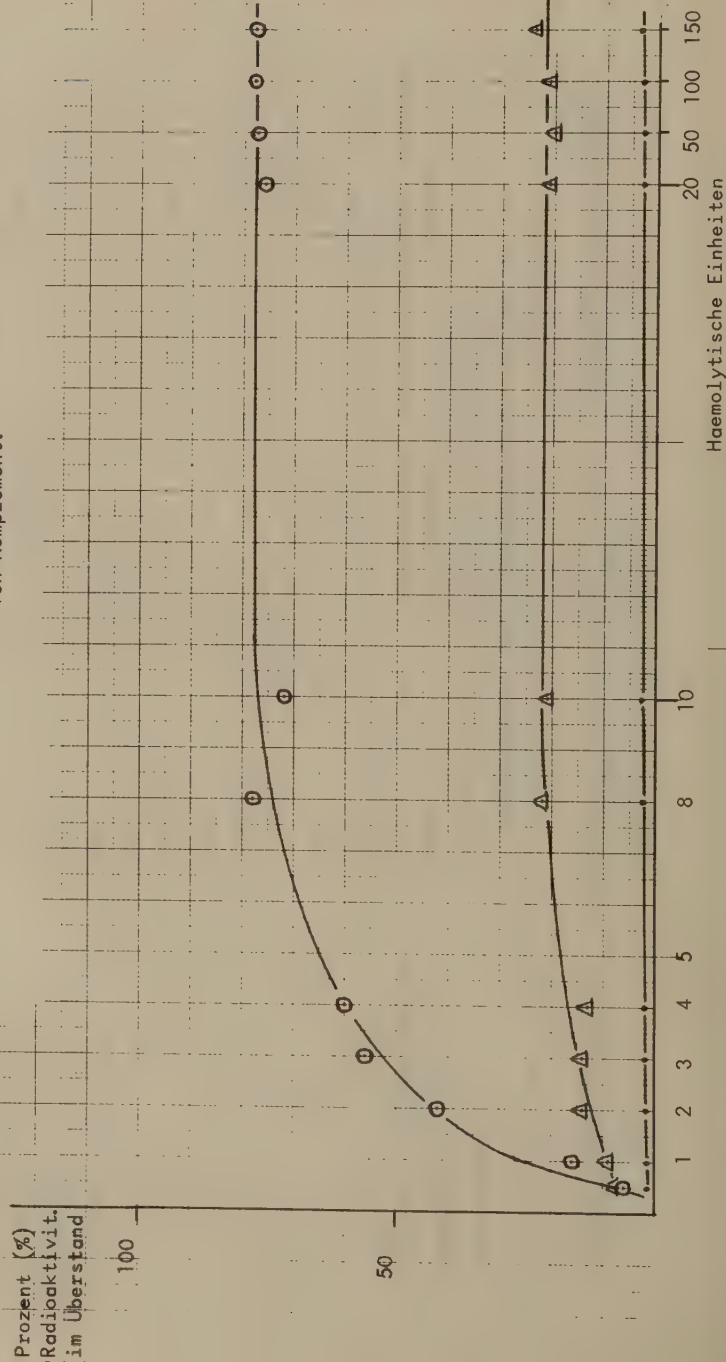
Freisetzung von Trasylol-J¹²⁵, Albumin-J¹²⁵ und Ferritin-J¹²⁵ unter der Einwirkung von Komplement

Hämolytische Einheiten (CH ₅₀)	Radioaktivität in der Sedimentfraktion (0,2 ml) bei Verwendung der Markersubstanzen:		
	Trasylol	Albumin	Ferritin
0,5	94	99	93
1,0	84	98	91
2,0	58	98	86
3,0	44	98	86
4,0	40	98	87
8,0	22	97	79
10,0	28	97	80
20,0	24	97	79
50,0	22	97	80
100,0	21	97	79
150,0	22	96	75
10 Ch ₅₆	94	98	93
Pufferkontrollen	94 / 94 / 95	98 / 98 / 98	92 / 93 / 92

○ Trasylol
 • Albumin
 △ Ferritin

Abb.(8) Versuch 16

Freisetzung von Trasylol, Albumin und Ferritin
 aus Erythrocyten -Stromata unter der Einwirkung
 von Komplement.



V. DISKUSSION

Einschleusung von Markermolekülen

Schon vor den grundlegenden Membranstudien von PASSOW (50) an Erythrozytenschatten war bekannt, daß während hypotoner Lyse Substanzen aus dem umgebenden Milieu in die Erythrozytenschatten eindringen können. So beschrieb GOURLEY (26) 1957 eine Methode zur Herstellung menschlicher Erythrozytenschatten, bei der während hypotoner Haemolyse Metabolite wie Glukose-6-Phosphat, Adenosin, Guanosin, ATP u. a. in Erythrozyten eingeschleust werden und anschließend in den Schatten in höherer Konzentration vorliegen als in den ursprünglich intakten Erythrozyten. HOFFMAN wies 1958 nach, daß auch Makromoleküle wie Fe^{59} markiertes Haemoglobin und J^{131} markiertes Albumin während hypotoner Lyse gegen das in den Erythrozyten enthaltene Haemoglobin ausgetauscht werden können (35).

KLIBANSKY, de VRIES und KATCHALSKY bestätigten dies 1960 mit anderen Nachweismethoden (43). Sie betonten den Wert der progredienten Lyse über 2 Stunden durch langsame Senkung der Ionenkonzentration im umgebenden Milieu und wiesen darauf hin, daß eine kritische Grenze von 0,03 molar Kochsalzkonzentration nicht unterschritten werden darf, wenn nicht irreversible Membranschädigungen auftreten sollen.

In eigenen Versuchen haben wir ebenfalls versucht, Markersubstanzen unter langsamer Senkung der Ionenkonzentration in Erythrozyten einzuschleusen. Es gelang uns ebenfalls ohne Schwierigkeiten, verschiedene makromolekulare Markersubstanzen während hypotoner Haemolyse in Erythrozytenschatten einzuschließen, doch war die Menge an eingeschleusten Markermolekülen bei progredienter Haemolyse stets geringer als bei akuter Haemolyse. Außerdem zeigte sich, daß bei länger dauernder Hypotonie die Membran der Erythrozytenschatten offenbar geschädigt wird, da die Erythrozytenschatten unter diesen Umständen

die Radioaktivität langsam wieder an das umgebende Medium verloren. Einschleusung von Markersubstanzen in Erythrozytenschatten durch akute kurzfristige hypotone Haemolyse erwies sich demnach in unseren Versuchen als vorteilhafter. Dies mag damit zusammenhängen, daß wir aus Gründen der Komplementmethodik nicht mit frischen, sondern mit 1 Woche lang gealterten Hammelerythrozyten gearbeitet haben, die wahrscheinlich nach Hypotonie weniger leicht stabilisiert werden können als frische Erythrozyten.

BETKE und KLEIHAUER zeigten 1964 den freien Ein- und Austritt von Haemoglobin bzw. den Austausch von Erwachsenen-Haemoglobin gegen fötales Haemoglobin (Hb_f) in Erythrozytenschatten in hypotonem Milieu (11). Durch Nachinkubation in isotoner Kochsalzlösung blieb das ausgetauschte fötale Haemoglobin fest in den Erythrozytenschatten eingeschlossen. BETKE und KLEIHAUER wiesen insbesondere darauf hin, daß im Stadium der Hypotonie die Membran für Moleküle von der Größenordnung des Haemoglobins durchlässig bleibt, so daß Haemoglobinmoleküle die Membran in beiden Richtungen passieren können. Die osmotische Haemolyse wäre demnach kein Ereignis, bei dem die Poren unter dem starken kolloidosmotischen Druck akut entstehen und sich anschließend nach dem Austritt des Haemoglobins wieder schließen, sondern während der Hypotonie blieben Poren in der Membran der Erythrozyten bestehen. Diese Schlußfolgerungen lassen sich auch durch das Ergebnis unserer Experimente stützen. Wird Albumin J^{125} 15 Minuten nach erfolgter Haemolyse in hypotonem Milieu einer Präparation von Erythrozytenschatten zugesetzt, so steigt die Radioaktivität in den Erythrozytenschatten mit zunehmender Zeitdauer an. Das ist ein eindeutiger Hinweis darauf, daß im Zustand der Hypotonie Albumin aus dem umgebenden Milieu in die Erythrozytenschatten eindringen kann, und daß demnach in den Erythrozytenschatten in hypotonem Zustand Poren offen sein müssen, durch die Albumin in die Schatten penetriert.

Diese Poren entstehen sehr rasch bei Erreichen des hypotonen Zu-

standes, wahrscheinlich innerhalb weniger Sekunden (siehe Versuch 12).

Erstaunlich bleibt, daß die großen Poren, durch die selbst so große Moleküle wie die Moleküle des Ferritins hindurchtreten können, sich nach Isotonisierung des Mediums wieder schließen. Das Auftreten von Poren unter der Hypotonie ist demnach prinzipiell ein reversibler Vorgang. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PASSOW zeigen die in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse, daß die Nachinkubation in isotonem Milieu dazu beiträgt, die Membran von Erythrozytenschatten zu stabilisieren. Bei Einschaltung einer Nachinkubationsperiode von einer Stunde bei 37° in isotonem Milieu war die Aktivität in den Erythrozytenstromata immer wesentlich höher als ohne eine solche Nachinkubationsperiode.

PASSOW (50) teilte außerdem mit, daß die Inkubationstemperatur in der hypotonen Phase einen erheblichen Einfluß auf die spätere Stabilisierung der Erythrozyten in isotonem Milieu hat. Unsere Erfahrungen decken sich mit den Angaben von PASSOW. Es ergeben sich stabilere, die Radioaktivität besser zurückhaltende Erythrozytenschatten, wenn die Hypotonie in der Kälte, d.h. bei 0°C auf die Erythrozyten einwirkt.

In unseren Experimenten wurden drei makromolekulare Markersubstanzen, nämlich Trasylol, Albumin und Ferritin in Erythrozytenstromata eingeschleust. Wie zu erwarten, ließen sich die Erythrozytenstromata mit Trasylol, dem kleinsten Molekül, am leichtesten beladen. Unter optimalen Bedingungen konnten 12,9 % der eingesetzten Trasylol-Aktivität in die Erythrozytenstromata inkorporiert werden. Von Albumin ließ sich nur 4,2 % und von Ferritin nurmehr 2,5 % der eingesetzten Gesamtaktivität in die Erythrozytenschatten einschleusen. Hier zeigt sich klar, daß das Penetrationsvermögen der Markersubstanzen von ihrem Molekulargewicht abhängig ist. Je höher das Molekulargewicht der Markersubstanzen, desto weniger dringt in die Erythrozytenschatten ein. Aber immerhin wird deutlich, daß selbst ein so großes Molekül wie das Ferritin unter hypotonen

Bedingungen in die Erythrozytenschatten penetrieren kann.

SEEMAN wies 1967 anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen nach, daß während rascher oder auch progredienter hypotoner Lyse Ferritin und sogar kolloidales Gold in Erythrozyten eingeschleust werden können (54). Da Ferritin ein Molekulargewicht von 750 000 und einen Moleküldurchmesser von etwa 120 Å hat, müssen wenigstens vorübergehend Poren dieser Größenordnung entstanden sein. Ebenso konnten Goldpartikel mit einem Durchmesser von 25 - 150 Å in den hypoton lysierten Erythrozyten gefunden werden. Unsere Experimente bestätigen, daß sich Ferritin in erheblichem Maße in Erythrozytenschatten einschleusen läßt.

In seinen Versuchen über die Kinetik der Einschleusung wies SEEMAN nach, daß 15 Sekunden nach Lysebeginn bereits 50 % der Ghosts Ferritin enthielten und diese Rate nach 60 Sekunden auf 100 % angestiegen war. Um andererseits Aufschluß darüber zu erhalten, wie lange die Poren für Ferritin durchgängig blieben, wurde dieses in verschiedenen Zeitabständen nach Lysebeginn dem Versuchsansatz zugesetzt. Bei einem Zeitintervall von 15 Sekunden enthielten alle Ghosts Ferritin, während bei einem Intervall von 30 Sekunden, obgleich dann alle Zellen lysiert waren, lediglich 18 % Ferritin enthielten. Durch Glutaraldehydfixierung im Anschluß an die Lyse konnten die Ergebnisse noch weiter präzisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß in einem Zeitabschnitt von 10 - 20 Sekunden nach Beginn der hypotonen Lyse die Permeabilität der Membran für Ferritin einen steilen Gipfel aufweist. Auch diese Befunde konnten in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Es ist nicht nötig, die Hypotonie auf länger als 20 Sekunden auszudehnen, um ein Maximum an Markersubstanz in die Erythrozytenstromata einzuschleusen. Bei den Experimenten, die in Tabelle 1, 2 und 3 dargestellt sind, ist auffällig, daß die Sedimentaktivitäten mit zunehmender Hypotoniedauer abnehmen, obgleich die Erythrozytenstromatamembranen in isotonem Milieu durch Nachinkubation bei 37° eine Stunde lang stabilisiert wurden. Dieser

Befund kann so gedeutet werden, daß die Erythrozytenmembranen zu Beginn der akuten Phase der Hypotonie größere oder mehr Poren aufweisen als im weiteren Verlauf der Hypotonie. Vielleicht schließt sich ein Teil der entstandenen Poren wieder oder aber es entstehen in der akuten Phase zunächst größere Poren, die hinterher den Durchmesser der in der Hypotonie bleibenden Poren annehmen. Diese Frage läßt sich aufgrund unserer Experimente aber nicht entscheiden.

Zur Wirkung der getesteten Haemolysine

In den in dieser Arbeit geschilderten Experimenten wurden drei verschiedene Makromoleküle als Markersubstanzen in Erythrozytenschatten eingeschleust.

Es handelt sich erstens um den Proteinase-Inhibitor Trasylol. Trasylol ist ein basisches Polypeptid, das aus einer einzigen Aminosäurekette mit 58 Aminosäureresten besteht und durch drei Disulfidbrücken stabilisiert ist. Es konnte in reiner Form isoliert und kristallisiert werden. Sein Molekulargewicht beträgt 6512 (60). Nach HUBER handelt es sich um ein birnenförmig gestaltetes Molekül, das eine Länge von 29 Å und eine größte Breite von 19 Å hat (37). Weiter verwendeten wir als Markersubstanz Humanalbumin. Das Molekulargewicht von Humanalbumin beträgt etwa 69 000, der Moleküldurchmesser 74 Å (53). Humanalbumin wird in lyophilisierter Form mit einem elektrophoretischen Reinheitsgrad von 100 % geliefert. Als drittes Markermolekül verwendeten wir Ferritin, ein eisenhaltiges, wasserlösliches Protein, das in relativ hoher Konzentration in Milz und Leber verschiedener Säugetiere vorkommt. Abhängig vom Eisengehalt kann sein Molekulargewicht bis zu 750 000 betragen, der Moleküldurchmesser wird mit etwa 120 Å angegeben (32). In unseren Versuchen verwendeten wir cadmiumfreies, zweimal kristallisiertes Pferdemilzferritin.

Wenn unter der Einwirkung eines Haemolysins Moleküle bestimmter

Größenordnung die Erythrozytenschatten verlassen und in das umgebende Medium eintreten, dann ist das ein Beweis dafür, daß das Haemolysin in den Membranen der Erythrozytenstromata Löcher hervorgerufen haben muß, durch die die Passage der Markermoleküle nach außen erfolgen konnte. Von dieser Überlegung ausgehend, wurde die Wirkung von Komplement, von Streptolysin O, von Staphylolysin und von Saponin untersucht.

Die Experimente haben eindeutig gezeigt, daß nach der Einwirkung von Komplement Perforationen in der Membran der Erythrozytenstromata entstehen. Diese Löcher sind so groß, daß Trasyllolmoleküle frei austreten können. Nach Einwirkung von 8 CH_{50} Einheiten Komplement auf sensibilisierte Erythrozytenstromata wird ein Radioaktivitätsaustritt beobachtet, der einer 100 %igen Haemolyse entspricht. Andererseits bleiben unter diesen Bedingungen die Moleküle des Albumins und Ferritins in den Stromata eingeschlossen. Daraus kann man schließen, daß die Löcher, durch die Trasyllol ausgetreten ist, einen Durchmesser haben müssen, der kleiner ist als der von Molekülen des Albumins und Ferritins, d.h. kleiner als $74 \text{ \AA}$. Damit ist der Durchmesser der Perforationen kleiner als der Durchmesser der elektronenmikroskopisch beobachtbaren Läsionen, deren Durchmesser mit $85 - 95 \text{ \AA}$ angegeben wird. Diese Unterschiede mögen aber in prinzipiellen Unterschieden der Meßmethodik beruhen.

In den Experimenten mit Ferritin wurde unter der Einwirkung von Komplement der Austritt von etwa 15 % der eingeschlossenen J^{125} markierten Ferritinmoleküle beobachtet. Dieser Befund läßt sich am ehesten durch die Annahme erklären, daß das Ferritin niedermolekulare Verunreinigungen enthielt, die unter der Komplementeinwirkung aus den Stromata austraten. Untersuchungen mit hochgereinigten, immunchemisch einheitlichen Ferritinpräparaten müßten in der Zukunft noch ergänzend durchgeführt werden. Immerhin ist eindrucksvoll, daß auch nach Einwirkung höchster Komplementdosen ca. 85 % des eingeschleusten Ferritins permanent in den Erythrozytenstromata einge-

geschlossen bleiben.

Saponin wirkt als Lösungsvermittler für Membranlipide. Unter Einwirkung hoher Saponinkonzentrationen lösen sich Erythrozytenstromata vollkommen auf (18). Es ist daher nicht verwunderlich, daß es schon bei niedrigen Saponinkonzentrationen zu einem Austritt aller von uns eingeschleusten Makromoleküle, unabhängig von der Molekülgröße, gekommen ist. Die Saponinlyse wäre demnach keine kolloidosmotische Haemolyse, sondern eine Haemolyse, die zustande kommt durch Solubilisierung von Membranlipiden schon bei geringen Saponinkonzentrationen.

Unter der Einwirkung von Streptolysin kommt es mit steigender Toxin-konzentration zu einer progredienten Ausschleusung aller von uns benutzten Makromoleküle, unabhängig von der Molekülgröße. Das steht in Übereinstimmung mit den Membrandefekten, die elektronenmikroskopisch an Erythrozyten unter Streptolysin-0-Wirkung beobachtet wurden (19). Streptolysin 0 soll an Kaninchenerythrozyten über 500 Å große Löcher hervorrufen. Durch 500 Å große Löcher könnten natürlich Trasylol, Albumin und Ferritin leicht hindurchtreten. Die in dieser Arbeit mitgeteilten Beobachtungen stehen daher in guter Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur. Die Haemolyse durch Streptolysin 0 wäre demnach eine Form der Haemolyse, bei der so große Löcher in der Erythrozytenmembran auftreten, daß Haemoglobin unmittelbar in das äußere Medium entweichen kann.

Als weiteres Haemolysin wurde Staphylokokken- α -Toxin untersucht. Die entscheidende Beobachtung ist die, daß selbst höchste, stark haemolysierend wirkende Staphylolysinkonzentrationen keinen nennenswerten Austritt von Markermolekülen aus den Erythrozytenstromata hervorrufen. Das kleine Markermolekül Trasylol und natürlich auch alle größeren Markermoleküle bleiben nahezu vollständig in den Erythrozytenstromata eingeschlossen. Das weist darauf hin, daß die Läsionen, die bei der Einwirkung von Staphylolysin entstehen, kleiner sein müssen als dem Durchmesser des Trasylolmoleküls entspricht. Die

Läsionen in der Erythrozytenmembran, die unter Staphylolysineinwirkung entstehen, müssen demnach einen Durchmesser haben, der geringer ist als $29 \text{ \AA}$. Die Läsionen können keinesfalls identisch sein mit den ca. $90 \text{ \AA}$ im Durchmesser messenden Ringstrukturen, die man nach Einwirkung von α -Toxin elektronenmikroskopisch an Erythrozytenmembranen beobachten kann. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß diese Ringstrukturen auch als Molekülkomplexe des α -Toxins mit Membranphospholipiden aufgefaßt werden können. Staphylolysin verursacht demnach eine echte kolloidosmotische Haemolyse durch Perforationen in der Erythrozytenmembran, die noch erheblich kleiner sind als jene, die unter Komplementeinwirkung entstehen.

Ursprünglich wurden die in dieser Arbeit mitgeteilten Experimente unter der Fragestellung durchgeführt, ob überhaupt Löcher unter der Einwirkung von Komplement in der Membran von Erythrozytenstromata entstehen. Diese Frage kann nunmehr eindeutig mit "ja" beantwortet werden. Unter Komplementeinwirkung müssen in der Erythrozytenmembran Perforationen auftreten, deren Durchmesser geringer als $74 \text{ \AA}$ ist. Die von uns ausgearbeitete Versuchsmethodik läßt sich aber auch zum Studium anderer Haemolysine verwenden. Erste Ergebnisse in dieser Richtung wurden in dieser Arbeit mitgeteilt. Durch die Wahl weiterer Makromoleküle mit definierten Moleküldurchmessern könnte man die in den Erythrozytenmembranen unter der Einwirkung von Haemolysinen entstehenden Perforationen noch genauer ausmessen.

VI. Zusammenfassung

Um die Wirkung verschiedener haemolytischer Agenzien auf Membranen von Erythrozyten untersuchen zu können, wurde ein Testsystem entwickelt, das auf der Beladung von Erythrozyten-Stromata mit radioaktiven Molekülen von bekanntem Molekulargewicht beruht. Als Substanzen wurden Trasylol, Albumin und Ferritin mit Jod¹²⁵ markiert. Die Einschleusung dieser Substanzen in die Erythrozyten geschah während kurzfristiger hypotoner Lyse. Nach Reisotonisierung des Mediums erhält man Erythrozyten-Schatten mit radioaktivem Inhalt, der permanent in den Erythrozyten-Stromata eingeschlossen bleibt. Diese radioaktiv beladenen Erythrozyten-Schatten können als Testobjekte verwendet werden. Die Versuchsanordnung ermöglicht die genaue Bestimmung primär in der Membran auftretender Läsionen, unabhängig von der nachfolgenden Vergrößerung der Defekte, wie sie, bedingt durch kolloidosmotische Schwellung, bei intakten Erythrozyten auftritt.

Saponin führt zu einer Auflösung der Erythrozytenmembran. Alle Markermoleküle, unabhängig von ihrer Größe, treten schon bei geringen Saponinkonzentrationen aus den Stromata vollständig aus.

Staphylolysin ruft im Unterschied dazu diskrete Läsionen in der Membran hervor, die kleiner als 29 Å sein müssen, da Trasylol auch nach Einwirkung höchster Staphylolysinkonzentrationen in den Stromata eingeschlossen bleibt.

Unter der Einwirkung von Streptolysin O kommt es mit steigender Toxinkonzentration zu einer progredienten Ausschleusung aller benutzten Markermoleküle, unabhängig von der Molekülgröße. Man kann hieraus auf die Entstehung von Läsionen schließen, die sicher größer als 120 Å sein müssen.

Unter der Einwirkung von Komplement bleibt Albumin vollständig und Ferritin zu 85 % in den Stromata eingeschlossen. Trasylol tritt hin-

gegen vollständig aus den Stromata aus. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Läsionen in der Erythrozytenmembran, die unter Komplement-Einwirkung auftreten, kleiner als $74 \text{ \AA}$ sein müssen.

Staphylolysin und Komplement sind demnach haemolytische Agenzien, die durch die Erzeugung kleiner Löcher eine kolloidosmotische Haemolyse einleiten. Streptolysin und Saponin hingegen erzeugen in der Erythrozytenmembran so große Defekte, daß der Zellinhalt, d.h. Hämoglobin, unmittelbar aus den Zellen austreten kann.

VII. Literaturverzeichnis

1. ALOUF, J.E., RAYNAUD, M.: Action de la Streptolysine 0 sur les Membranes Cellulaires.
Annales de l'Institut PASTEUR 114, n^o 6, 812 - 827 (1968)
2. ALOUF, J.E., RAYNAUD, M.: Action de la Streptolysine 0 sur les Membranes Cellulaires.
Annales de l'Institut PASTEUR 115, n^o 1, 97 - 121 (1968)
3. ARBUTHNOTT, J.P.: Staphylococcal α -Toxin.
Aus "Microbial Toxins", Vol. III, ed. by Th.C. Montie, S. Kadis, S.J. Ajl
Acad. Press, N.Y. and London, 1970
Chapter 5, 189 - 236
4. BANGHAM, A.D., HORNE, R.W.: Action of Saponin on Biological Cell Membranes.
Nature 196, 952 - 953 (1962)
5. BERNHEIMER, A.W.: Properties of Certain Rapidly Acting Bacterial Toxins as Illustrated by Streptolysins 0 and S.
Bacteriological Reviews 12, 195 - 202 (1948) Baltimore
6. BERNHEIMER, A.W.: Disruption of Wall-less Bacteria by Streptococcal and Staphylococcal Toxins.
J. Bacteriol. 91, 1677 - 1680 (1966)
7. BERNHEIMER, A.W.: Cytolytic Toxins of Bacterial Origin.
Science 159, 847 - 851 (1968)
8. BERNHEIMER, A.W., SCHWARTZ, L.L.: Leucocidal Agents of Haemolytic Streptococci.
J. Path. Bact. 79, 37 - 46 (1960)
9. BERNHEIMER, A.W., SCHWARTZ, L.L.: Isolation and Composition of Staphylococcal α -Toxin.
J. Gen. Microbiol. 30, 455 - 468 (1963)
10. BETHGE, M.: Inauguraldissertation Giessen 1974, unveröffentlichte Experimente.
11. BETKE, K., KLEIHAEUER, E.: Einschleusung von Fremdhaemoglobin in Erythrocyten.
Folia Haematologica 83, 69 - 77 (1964)
12. BLADEN, H.A., EVANS, R.T., MERGENHAGEN, S.E.: Lesions in Escherichia Coli Membranes after Action of Antibody and Complement.
J. Bacteriol. 91, 2377 - 2381 (1966)

13. BLADEN, H. A., GEWURZ, H., MERGENHAGEN, S.E.: Interactions of the Complement System with the Surface and Endotoxic Lipopolysaccharide of *Veillonella Alcalescens*. *J. Exp. Med.* 125, 767 - 786 (1967)
14. BORSOS, T., DOURMASHKIN, R.R., HUMPHREY, J.H.: Lesions in Erythrocyte Membranes Caused by Immune Haemolysis. *Nature* 202, 251 - 252 (1964)
15. COOPER, L. Z., MADOFF, M. A., WEINSTEIN, L.: Hemolysis of Rabbit Erythrocytes by purified Staphylococcal α -Toxin. I: *J. Bacteriol.* 87, 127 - 135 (1964)
II: *J. Bacteriol.* 87, 136 - 144 (1964)
16. COULTER, J. R.: Production, Purification, and Composition of Staphylococcal α -Toxin. *J. Bacteriol.* 92, 1655 - 1662 (1966)
17. DAVIS, B. D., DULBECCO, R., EISEN, H. N., GINSBERG, H. S., WOOD jn., W. B.: Aus "Microbiology", Chapter 23, 714-715 (1970) Harper & Row, N.Y. Evanston/London and John Weatherhill, INC., Tokyo
18. DOURMASHKIN, R. R., DOUGHERTY, R. M., HARRIS, R. J. C.: Electron Microscopic Observations on ROUS Sarcoma Virus and Cell Membranes. *Nature* 194, 1116 - 1119 (1962)
19. DOURMASHKIN, R. R., ROSSE, W. F.: Morphologic Changes in the Membranes of Red Blood Cells undergoing Hemolysis. *American J. of Medicine* 41, 699 - 710 (1966)
20. FAUVE, R. M., ALOUF, J. E., DELAUNAY, A., RAYNAUD, M.: Cytotoxic Effects in vitro of Highly Purified Streptolysin O on Mouse Macrophages Cultured in a Serum - free Medium. *J. Bacteriol.* 92, 1150 - 1153 (1966)
21. FIESER, L. F., FIESER, M.: Aus "Steroids", Chapter 2 and 21, S. 29 - 31 bzw. S. 810 - 811
Reinhold Publishing Corporation, N.Y. Copyright 1959
22. FREER, J. H., ARBUTHNOTT, J. P., BERNHEIMER, A. W.: Interaction of Staphylococcal α -Toxin with Artificial and Natural Membranes. *J. Bacteriol.* 95, 1153 - 1168 (1968)
23. FRICKE, H.: The Rate of Escape of Hemoglobin from the Hemolysed Red Corpuscle. *J. Gen. Physiol.* 18, 103 - 107 (1934)

24. GINSBURG, I., GROSSOWICZ, N.: Effect of Streptococcal Haemolysins on EHRlich Ascites Tumour Cells.
J. Path. Bact. 80, 111 - 119 (1960)
25. GLAUERT, A. M., DINGLE, J. T., LUCY, J. A.: Action of Saponin on Biological Cell Membranes.
Nature 196, 953 - 955 (1962)
26. GOURLEY, D. R. H.: Human Erythrocyte Ghosts Prepared to Contain Various Metabolites.
J. Appl. Physiol. 10, 511 - 518 (1957)
27. GREEN, H., BARROW, P., GOLDBERG, B.: Effect of Antibody and Complement on Permeability Control in Ascites Tumor Cells and Erythrocytes.
J. Exp. Med. 110, 699 - 713 (1959)
28. GREEN, H., GOLDBERG, B.: The Action of Antibody and Complement on Mammalian Cells.
Ann. New York Acad. Sci. 87, 352 - 361 (1960)
29. GREENWOOD, F. C., HUNTER, W. M., GLOVER, J. S.: The Preparation of J^{131} -Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity.
Biochem. J. 89, 114 - 123 (1963)
30. HABERMANN, E., MÖLBERT, E.: Zur morphologischen Differenzierung der Hämolyse durch Bienengift, Schlangengift, Lysocithin und Digitonin.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 223, 203 - 216 (1954)
31. HABERMANN, E., POHLMANN, G.: Morphologische Erythrocytenveränderungen durch α - u. β -Hämolysin aus Gasbrandgift.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 237, 487 - 494 (1959)
32. HAGGIS, G. H.: The Iron Oxide Core of the Ferritin Molecule.
J. Mol. Biol. 14, 598 - 602 (1965)
33. HALBERT, S. P.: Streptolysin O.
In "Microbial Toxins", Vol. III, ed. by Th. C. Montie, S. Kadis, S. J. Ajl
Acad. Press. N. Y. and London, 1970
Chapter 2, pp. 69 - 98
34. HIRSCH, J. G., BERNHEIMER, A. W., WEISSMANN, G.: Motion Picture Study of the Toxic Action of Streptolysins on Leucocytes.
J. Exp. Med. 118, 223 - 227 (1963)

35. HOFFMAN, J.F.: Physiological Characteristics of Human Red Blood Cell Ghosts.
J. Gen. Physiol. 40, 9 - 28 (1958)
36. HOWARD, J.G., WALLACE, K.R.: The Comparative Resistances of the Red Cells of Various Species to Haemolysis by Streptolysin O and by Saponin.
Brit. J. Exp. Pathol. 34, 181 - 184 (1953)
37. HUBER, R.D., KUKLA, D., RÜHLMANN, A., EPP, O., FORMANEK, H.: The Basic Trypsin Inhibitor of Bovine Pancreas.
1. Structure Analysis and Conformation of the Polypeptide Chain.
Naturwissenschaften 57, 389 - 392 (1970)
38. HUMPHREY, J.H., DOURMASHKIN, R.R.:
Aus "Immunopathology", IIIrd International Symposium, Jan. 1963
Edited by P. Grabar, Paris, P.A. Miescher, New York
Schwabe & Co, Publishers, Basel/Stuttgart, pp. 369 - 385
39. HUMPHREY, J.H., DOURMASHKIN, R.R.: Electron Microscope Studies of Immune Cell Lysis.
Ciba Foundation Symposium, ed. by B.E.W. Wolstenholme and J. Knight
J. & A. Churchill, London, 175 - 188 (1965)
40. HUMPHREY, J.H., DOURMASHKIN, R.R.: The Lesions in Cell Membranes Caused by Complement.
Advances in Immunology 11, 75 - 115 (1969)
Academic Press, N.Y. and London
41. HUSSON, F., LUZZATI, V.: Structure of Red - Cell Ghosts and the Effect of Saponin Treatment.
Nature 197, 822 (1963)
42. KATCHALSKY, A., KEDEM, O., KLIBANSKY, C., de VRIES, A.: Rheological Considerations of the Haemolysing Red Blood Cell.
In "Flow Properties of Blood and Other Biological Systems" pp. 155 - 171. A.L. Copley and G. Stainsly, editors,
Pergamon Press N.Y. 1960
43. KLIBANSKY, C., de VRIES, A., KATCHALSKY, A.: La Pénétration de l'Albumine et de l'Hémoglobine dans les Erythrocytes au cours de l'Hémolyse.
Pathol. Biol. 8, 2005 - 2014 (1960)

44. LOMINSKI, I., ARBUTHNOTT, J.P.: Some Characteristics of Staphylococcus α -Haemolysin.
J. Pathol. Bacteriol. 83, 515 - 520 (1962)
45. MADOFF, M.A., COOPER, L.Z., WEINSTEIN, L.: Hemolysis of Rabbit Erythrocytes by Purified Staphylococcal α -Toxin.
J. Bacteriol. 87, 145 - 149 (1964)
46. MARUCCI, A.A.: Mechanism of Action of Staphylococcal α -Hemolysin.
I: J. Bacteriol. 86, 1182 - 1188 (1963)
II: J. Bacteriol. 86, 1189 - 1195 (1963)
47. MAYER, M.M.: Aus "KABAT and MAYER's Experimental Immunchemistry". Chapter 4: Complement and Complement Fixation. Pp. 133 - 240
Charles C. Thomas Publisher, Springfield. Illinois
Sec. Edition, Sec. Printing (1964)
48. MEDHURST, F.A., GLYNN, A.A., DOURMASHKIN, R.R.: Lesions in Escherichia Coli Cell Walls Caused by the Action of Mouse Complement.
Immunology 20, 441 - 450 (1971)
49. PARPART, A.K., BALLENTINE, R.: Molecular Anatomy of the Red Cell Plasma Membrane.
Aus "Modern Trends in Physiology and Biochemistry",
pp. 135 - 148
E.S.C. Barron, Editor Academic Press Inc., N.Y., 1952
50. PASSOW, H.: Ion Permeability of Erythrocyte Ghosts.
Aus "Laboratory Techniques in Membrane Biophysics",
pp. 21 - 27
Edited by H. Passow and R. Stämpfli, Springer Verlag,
N.Y. 1969
51. PONDER, E.: Hemolysis and Related Phenomena.
Grune & Stratton, Inc. New York (1948)
52. SAVITZ, D., SIDEL, V.W., SOLOMON, A.K.: Osmotic Properties of Human Red Cells.
J. Gen. Physiol. 48, 79 - 94 (1964)
53. SEARS, D.A., WEED, R.I., SWISHER, S.N.: Differences in the Mechanism of In Vitro Immune Hemolysis Related to Antibody Specificity.
J. clin. Invest. 43, No. 5, 975 - 985 (1964)
54. SEEMAN, P.: Transient Holes in the Erythrocyte Membrane during Hypotonic Hemolysis and Stable Holes in the

Membrane after Lysis by Saponin and Lysolecithin.
J. Cell Biology 32, 55 - 70 (1967)

55. SEEMAN, P., ILES, G.H.: Pits in the Freeze-Cleavage Plane of Normal Erythrocyte Membranes; and Ultrastructure of Membrane Lesions in Immune Lysis. Pp. 169 - 180 Aus "Red Cell Shape" (M. Bessis, R.I. Weed, P.F. Leblond, eds.) Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin (1973)
56. SOLOMON, A.K.: Red Cell Membrane Structure and Ion Transport. J. Gen. Physiol. 43, 1 - 15 (1960), Supplement May Issue, 1960
57. TODD, E.W.: The Differentiation of two Distinct Serological Varieties of Streptolysin, Streptolysin O and Streptolysin S. J. Pathol. Bacteriol. 47, 423 - 445 (1938)
58. WEISSMANN, G., SESSA, G., BERNHEIMER, A.W.: Staphylococcal α -Toxin: Effects on Artificial Lipid Spherules. Science 154, 772 - 774 (1966)
59. WELLENSIEK, H.J.: Das Komplement - System. Verh. Dtsch. Ges. Path. 54, 37 - 52 (1970)
60. WERLE, E.: Chemie und Wirkungsweise des Trasylol. Sonderdruck aus "Langenbecks Archiv für Chirurgie" 325, 284 - 288 (1969)
61. WILBRANDT, W.: Über Konservierung menschlichen Blutes. Schweiz. Med. Wschr. 70, 731 - 735 (1940)
62. ZUCKER - FRANKLIN, D.: Electron Microscope Study of the Degranulation of Polymorphonuclear Leucocytes Following Treatment with Streptolysin. Am. J. Pathol. 47, 419-425 (1965)

Herrn Prof. Dr. med. H.J. WELLENSEK, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen, möchte ich für die Überlassung des Themas, für Anregungen und freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Arbeit danken.

Herr Prof. Dr. med. E. HABERMANN, Direktor des Pharmakologischen Institutes der Universitäts-Kliniken Giessen, gab entscheidende Anregungen bezüglich der Versuchsanordnung sowie Hinweise und korrigierende Vorschläge. Ich danke ihm ganz besonders.

Herr Dr. K. RÄKER, Pharmakologisches Institut der Universität Giessen, stellte dankenswerterweise die von ihm mit J¹²⁵ markierten Substanzen zur Verfügung.

Herrn Dr. med. A. SZIEGOLEIT aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitäts-Kliniken Giessen bin ich für Überlegungen und Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit ganz besonders zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1. Februar 1938 wurde ich, Heinrich Schmitt, in Oldenburg i. O. geboren.

Von 1945 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Oldenburg - Etzhorn, anschließend das Alte Gymnasium in Oldenburg, an dem ich 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einjähriger Volontärzeit bei der Bremer Landesbank in Oldenburg begann ich im Wintersemester 1961/62 in Göttingen mit dem Medizinstudium; nach dem Vorphysikum setzte ich mein Studium in Giessen fort, wo ich am 12. 7. 68 das Staatsexamen ablegte.

Als Medizinalassistent war ich zunächst ein Jahr an der Univ. Haut-Klinik Giessen tätig, anschließend leistete ich die Pflichtassistentenzeit an der Medizinischen Poli-Klinik, der Chirurgischen Univ.-Klinik sowie der Univ. Frauen-Klinik in Giessen ab.

Von September 1970 bis August 1971 war ich als Medizinalassistent am Institut für Medizinische Mikrobiologie Giessen beschäftigt.

Am 13. 5. 71 erhielt ich die Bestallung als Arzt. Seit dem 1. September 1971 arbeite ich als Assistent an der Univ. Haut-Klinik in Giessen.

Verzeichnis der Mitglieder

Am 1. Januar 1900 waren im Verein 100 Mitglieder.

Von 1890 bis 1900 waren im Verein 100 Mitglieder.

Der Verein hat im Laufe der Jahre einen Zuwachs an Mitgliedern erfahren.

Die Mitgliederzahl ist im Laufe der Jahre auf 1000 gestiegen.

Die Mitgliederzahl ist im Laufe der Jahre auf 1000 gestiegen.

Die Mitgliederzahl ist im Laufe der Jahre auf 1000 gestiegen.

